

THESE

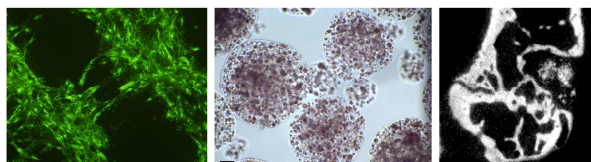
Pour l'obtention du diplôme de
DOCTORAT DE L'UNIVERSITE VICTOR SEGALEN BORDEAUX 2
Mention Sciences, Technologie, Santé
Option Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Soutenue publiquement le 24 Novembre 2008 par

Adeline Maritie GRELLIER

Née le 21/05/1981 à Bordeaux

LA COMMUNICATION OSTEO-ENDOTHELIALE : APPLICATION EN INGENIERIE DU TISSU OSSEUX



Thèse dirigée par le **Docteur Joëlle AMEEDÉ** et le **Professeur Mário A. BARBOSA**

Membres du jury

Pr. Laurence BORDENAVE, Bordeaux
Dr. Didier LETOURNEUR, Paris
Dr. Pierre MARIE, Paris
Dr. Pedro GRANJA, Porto
Pr. Josep PLANELL, Barcelona
Dr. Joëlle AMEEDÉ, Bordeaux

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de Thèse

Cette thèse a été co- dirigée par le **Docteur Joëlle AMELEE**
et par le **Professeur Mário A. BARBOSA**.

Ce travail de thèse a été réalisé

- au sein de l'unité **INSERM U577** "Biomatériaux et Réparation Tissulaire" – Université Victor Segalen Bordeaux 2 (France) ;
- ainsi qu'au sein de **INEB**, "Instituto de Engenharia Biomédica" – Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (Portugal).

A ma famille,

A mon frère et mes parents.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Joëlle Amédée pour avoir encadré ce travail de thèse, m'avoir guidée et conseillée. Ça a été un réel plaisir de travailler avec toi.

Mes remerciements vont également au Professor Mário Barbosa pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire « Instituto de Engenharia Biomédica », INEB, à Porto. Je lui suis reconnaissante d'avoir accepté de co-encadrer ce travail et de m'avoir apportée ses conseils avisés.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Pedro Granja pour m'avoir toujours conseillée avec beaucoup de compétence et d'enthousiasme. Muito obrigada pelo teu bom humor permanente. Até Já !

Je remercie tout particulièrement Laurence Bordenave pour la confiance qu'elle m'a témoignée lors de mon stage de Master Recherche et pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Messieurs Pierre Marie et Didier Letourneur ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, et je les en remercie vivement.

Josep Planell et Pedro Granja m'ont fait l'honneur de participer au Jury de soutenance en tant qu'examineurs; je les en remercie profondément.

Merci également à toute l'équipe de l'unité INSERM U577 tant pour leur sympathie que pour leur participation à ce travail de thèse : Reine Bareille, Chantal Bourget, Richard Daculsi, Murielle Rémy, Marie-Christine Durrieu, Fabien Guillemot, Jean-Christophe Fricain, Olivier Chassande, Philippe Fernandez, Laurent Latxague, Guillaume Forget, et tous les autres ... um beijo especial pour Fanny Bourrée et Céline Chollet !

Um especial obrigada para a equipa feminina do INEB:

Susana Gueirero, Raquel Gonçalves, Liliana Pires, Patricia Cardoso, Inês Gonçalves, Alis Mateus, Meriem Lamghari, Cristina Barrias, Cristina Martins, Ana Paula Pêgo, Susana Carrilho, Isabel Carvalho, Maria Oliveira, Perpétua Pinto do Ó, Isabel Amaral, ...

E também para a Sílvia Bidarra e a Susana Oliveira, muito simpáticas co-alocatarías! E Beijinhos para o JP!

Merci à tous mes amis qui, même éloignés géographiquement, sont restés proches.

Enfin, je tiens à remercier du fond du coeur ao meu Hugo who was always there for me...

RESUME

La communication ostéo-endothéliale: application en ingénierie du tissu osseux

Le développement et le remodelage du tissu osseux dépendent d'une étroite coordination entre les cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques, responsables de la formation et résorption osseuse respectivement, mais aussi entre les cellules osseuses et les cellules endothéliales présentes dans les vaisseaux sanguins environnants.

Le but de ce travail est d'étudier la communication entre les ostéoprogéniteurs issus de la moelle osseuse (human osteoprogenitors: HOPs) et les cellules endothéliales (human umbilical cord endothelial cells: HUVECs).

Cette communication ostéo-endothéliale a été analysée dans un modèle de co-culture *in vitro* en 2D mais aussi en 3D au sein microsphères d'alginate qui ont été ensuite implantées *in vivo* dans une lésion osseuse chez la souris *nude*.

Dans un premier temps, nous avons complété la caractérisation des HOPs. Le phénotype de ces cellules est régulé lorsqu'elles sont soumises à des contraintes mécaniques, paramètre fondamental *in situ*. En co-culture avec les HUVECs, le phénotype ostéoblastique des HOPs est également régulé et le VEGF (vascular endothelial growth factor) participe de façon étroite à cette régulation. Le phénotype endothélial semble lui aussi modifié en co-culture puisque la migration des HUVECs semble être à l'origine d'un réarrangement cellulaire proche de capillaires. Au sein de microsphères d'alginate cultivées *in vitro*, les HUVECs stimulent le phénotype ostéoblastique des HOPs. De même, la présence des HUVECs active la minéralisation induite par les HOPs dans une lésion osseuse réalisée *in vivo*.

Cette étude montre que ces cellules sont capables de communiquer et pourraient être à la base de nouvelles stratégies d'ingénierie tissulaire.

MOTS-CLES

Ostéoprogéniteurs humains, Cellules endothéliales humaines, Contraintes mécaniques, VEGF, Ingénierie tissulaire, Microsphères

ABSTRACT

Osteo-endothelial cell communication: application in bone tissue engineering

Bone development and remodelling are dependant on a tight cell cooperation between osteoblastic and osteoclastic cell types, respectively responsible for bone formation and degradation. Angiogenesis is also a key process involved in these mechanisms and cell communication between osseous and endothelial cells is fundamental.

This work aims to study cell communication between human osteoprogenitors (HOPs) arising from bone marrow and human endothelial cells (human umbilical cord endothelial cells: HUVECs).

Osteo-endothelial communication was analysed using a well defined *in vitro* co-culture model in 2D but was also enlarged into a 3D system using alginate microspheres which were then implanted *in vivo* into a bone defect in *nude* mice.

The HOPs were submitted to a mechanical stress which is an important parameter for the physiology of bone. Their ability to regulate their phenotype was demonstrated under shear stress. In co-culture with HUVECs, the osteoblastic phenotype was regulated and VEGF (vascular endothelial growth factor) seems to be involved in this regulation. The endothelial phenotype was also regulated in co-culture since HUVEC migration led to a tubular-like cell rearrangement. Using the alginate microsphere model cultured *in vitro*, the HUVECs stimulated the osteoblastic phenotype of HOPs. Moreover, after implantation in a bone defect *in vivo*, the HUVECs enhanced the HOP-induced mineralization.

This work shows that the cells are able to communicate and seems promising for the development of new tissue engineering strategies.

KEYWORDS

Human osteoprogenitors, Human endothelial cells, Mechanical stress, VEGF, Tissue engineering, Microspheres

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	7
LISTE DES ABBREVIATIONS	10
LISTE DES FIGURES	13
INTRODUCTION	15
I. Le tissu osseux	16
A. Fonctions du tissu osseux	16
B. Structure du tissu osseux	16
1) L'os cortical	17
2) L'os trabéculaire	18
C. Les éléments cellulaires	18
1) Les ostéoprogéniteurs.....	18
2) La lignée ostéoblastique	19
a) Les ostéoblastes.....	19
b) Les cellules bordantes	22
c) Les ostéocytes.....	22
3) La lignée ostéoclastique.....	23
D. La matrice extracellulaire et le remodelage osseux	25
1) La matrice extracellulaire	25
a) La phase minérale	26
b) La phase organique	26
2) Le remodelage osseux.....	29
a) Le cycle du remodelage osseux	29
b) La régulation du remodelage osseux.....	30
II. La relation entre le tissu osseux et les vaisseaux sanguins	36
A. La vascularisation dans le tissu osseux	36
1) La formation de vaisseaux sanguins	36
2) La vascularisation du tissu osseux.....	37
B. La communication ostéo-endothéliale	40
1) Les niches ostéoblastique et vasculaire dans la moelle osseuse.....	40
a) La niche ostéoblastique	40
b) La niche vasculaire	41
2) Les modes de communication cellulaire	42
a) Les jonctions cellulaires.....	42
b) Les interactions cellules – matrice extracellulaire.....	47
c) Contrôle paracrine de la communication ostéo-endothéliale	49
3) La communication ostéo-endothéliale.....	56
a) Les modèles <i>in vitro</i>	56
b) Les modèles <i>in vivo</i>	59
III. La réparation du tissu osseux	61

A. Mécanismes physiologiques de la réparation naturelle.....	61
1) L'ossification intramembranaire et endochondrale	61
2) Rôle du microenvironnement fracturaire	62
a) L'environnement biochimique et cellulaire	62
b) L'environnement mécanique.....	64
B. Réparation du tissu osseux guidée par les biomatériaux.....	67
1) Le concept d'ingénierie tissulaire	67
2) Les acteurs de l'ingénierie tissulaire	68
a) La composante matricielle	68
b) La composante cellulaire	70
c) Les facteurs bioactifs.....	72
d) La composante mécanique : intérêt des bioréacteurs	72
C. Applications cliniques dans le domaine de la reconstruction osseuse..	75
OBJECTIFS.....	77
RESULTATS	81
I. Les modèles cellulaires sollicités dans la reconstruction d'un os vascularisé	82
A. Introduction	82
1) Le modèle de cellules endothéliales	82
2) Le modèle de cellules ostéoblastiques.....	85
B. Article : La régulation du phénotype des cellules ostéoprogénitrices en réponse à des contraintes de cisaillement	88
C. Conclusions	108
II. La communication ostéo-endothéliale dans un système de co-culture <i>in vitro</i> en double dimension.....	110
A. Introduction	110
B. Article : Rôle du VEGF dans la communication ostéo-endothéliale	111
C. Conclusions	134
III. La communication ostéo-endothéliale dans une matrice tridimensionnelle	140
A. Introduction	140
B. Article : La communication ostéo-endothéliale dans une matrice tridimensionnelle	143
C. Conclusions	168
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES.....	170
ANNEXES	174
Annexe 1. Compléments de matériels et méthodes.....	175
Annexe 2. Transduction du signal et activité pro-coagulante des PDECs issus de sang de cordon ombilical après stimulation à IL-1α	180

Annexe 3. Transduction du signal inhabituelle des cellules endothéliales progénitrices et matures en réponse à une stimulation par des contraintes de cisaillement	191
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	197
BIBLIOGRAPHIE	201

LISTE DES ABBREVIATIONS

μCT: micro-Computed Tomography (micro-tomographie assistée par ordinateur)
ADN: Acide Désoxyribonucléique
aFGF: acid Fibroblast Growth Factor (FGF-1)
Akt: Protein Kinase B (PKB)
ALK: Activin Receptor-like Kinase
ALP: Alkaline Phosphatase
AMPc: adénosine monophosphate cyclique
ATP: adénosine triphosphate
bFGF: basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2)
BMP: Bone Morphogenesis Protein
BMPR: Bone Morphogenesis Protein Receptor
BSP: Bone Sialoprotein
Ca²⁺: Calcium
Cadh: Cadhérine
CAM: Molécules d'adhésion cellulaire (Cell Adhesion Molecule)
Cbfa1/Runx2: Core-binding factor A1 / Runt-related transcription Factor-2
Col-I: Collagène de type I
Co-Smad : Common mediator Smad
Cx: Connexine
CxRE: Connexin Response Element
CYR61: Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61 (ou CCN1)
DAPI: Diamidino-4',6-phénylindol-2 dichlorhydrate
Dkk1: dickkopf Homolog 1
E-Cadh: Cadhérine Epithéliale
ECGS: Endothelial Cell Growth Supplement
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
EGF: Epithelial Growth Factor
eNOS: endothelial Nitric Oxide Synthase
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase
ET-1: Endotéline-1
FAK: Focal Adhesion Kinase
Flt-1: VEGFR-1 (Fms-related tyrosine kinase 1)
GMPc: guanylate monophosphate cyclique
HBMSCs: Human Bone Marrow Stem Cells
HDMECs: Human Dermal Microvascular Endothelial Cells
HGF: Hepatocyte Growth Factor
HOPs: Human Osteoprogenitors
HSAVECs: Human Saphenous Vein Endothelial Cells
HSCs: Hematopoietic Stem Cells (Cellules souches hématopoïétiques)
HUVECs: Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IGF: Insulin-like Growth Factor
IL: Interleukine
IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium

IP3: inositol-1,4,5-trisphosphate
 KDR: VEGFR-2 (Kinase insert domain receptor)
 MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
 M-CSF: Macrophage-Colony Stimulating Factor
 MEC: Matrice ExtraCellulaire
 MMP: Matrix Metalloprotease (Métalloprotéase matricielle)
 MSCs: Mesenchymal Stem Cells (Cellules souches mésenchymateuses)
 N-Cadh: Cadhérine Neurale
 NFκB : Nuclear Factor kappa B
 NO: Nitric Oxide (oxide nitrique)
 OB: Ostéoblaste
 OB-Cadh (Cadh11): Osteoblastic Cadherin (Cadherine ostéoblastique, Cadherine 11)
 OC: Ostéocalcine
 OPG: Ostéoprotégérine
 OSE: Osteoblast Specific cis-acting Element
 Osx: Osterix
 PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1
 PAL: Phosphatase Alcaline (ALP)
 PDGF: Platelet Derived Growth Factor
 PECAM: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (ou CD31)
 PGA: Acide poly-glycolique
 PGE2: Prostaglandine 2
 PI3K: phosphoinositide 3-Kinase
 PKC: Protéine Kinase C
 PLGA: Acide Polylactique-glycolique
 PIGF: Placenta Growth Factor
 PTH: Parathyroid Hormone
 RANK: Receptor Activating NF-κB
 RANKL: Receptor Activating NF-κB Ligand
 R-Cadh (Cadh4): Cadherine Rétinale (Cadherine 4)
 REDV : Arginine-Acide Glutamique-Acide Aspartique-Valine
 RGD: Arginine-Glycine-Acide Aspartique
 R-Smad : Receptor-regulated Smad
 RT-PCR: Retro-transcriptase Polymerase Chain Reaction
 SAB: Sérum Albumine Bovine
 SDF-1 : Stromal Derived Factor-1 (CXCL12)
 Smad: mother against decapentaplegic homolog
 SPECT: Single photon emission computed tomography (ou TEMP : tomographie d'émission monophotonique)
 SVF: Sérum de Veau Foetal
 TF: Tissue Factor (Facteur Tissulaire)
 TGFβ R: Transforming Growth Factor β Receptor
 TGFβ: Transforming Growth Factor β
 TIMP: Tissue Inhibitor Metalloproteinase (Inhibiteur tissulaire de MMP)
 TNF: Tumor Necrosis Factor
 tPA: tissue Plasminogen Activator

TRAP: Phosphatase Acide Tartrate Résistante (Tartrate Resistant Acid Phosphatase)
uPA: urokinase Plasminogen Activator
VDR: Vitamin D Receptor
VE-Cadh (Cadh5): Cadhérine Endothéliale Vasculaire (Vascular Endothelial) (Cadhérine 5)
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
vWF: von Willebrand Factor
YIGSR: Tyrosine-Isoleucine-Glycine-Serine-Arginine
ZO-1: Zona-Occludens-1

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Le squelette humain (A) et la structure des os longs (B).....	17
Figure 2. Les types d'os et leur organisation au sein des os longs.	18
Figure 3. La différenciation des cellules souches de la moelle osseuse [Yin and Li, 2006].	19
Figure 4. Expression des marqueurs ostéoblastiques au cours de la différenciation [Bilezikian et al., 1996].	20
Figure 5. Différenciation des cellules stromales en cellules ostéoblastiques [Thomas et al., 2008].	21
Figure 6. Ostéocytes en culture, reliés entre eux par leurs prolongements cytoplasmiques [Klein-Nulend et al., 2005].	23
Figure 7. Différenciation des cellules ostéoclastiques [Thomas et al., 2008].....	24
Figure 8. La résorption de la matrice osseuse par les ostéoclastes [Thomas et al., 2008].	25
Figure 9. Deux ostéoblastes (OB) entourés de la matrice extracellulaire composée des deux phases : organique (PO) et minérale (PM) [Choi et al., 2002].	25
Figure 10. Schéma représentatif de l'assemblage du collagène de type I [Rouwkema, 2007]	27
Figure 11. Cycle du remodelage osseux, (Université de Michigan, http://www.umich.edu/).	30
Figure 12. Voie de signalisation induite par les BMPs lors de la stimulation de la différenciation ostéoblastique [Abe, 2006].	32
Figure 13. Mécanismes de la vasculogenèse (A) et de l'angiogenèse (B) [Lamallice et al., 2007].	36
Figure 14. Structure et formation des vaisseaux sanguins [Jain, 2003].	37
Figure 15. La Vascularisation Osseuse.	38
Figure 16. Rôle central du VEGF et des BMPs lors de la communication entre cellules endothéliales et ostéoblastiques [Lecanda et al., 1998].	39
Figure 17. Les niches ostéoblastique et vasculaire de cellules souches dans la moelle osseuse soumises aux mécanismes de « mobilisation » et de « homing » [Yin and Li, 2006].	41
Figure 18. Les modes de communication entre les cellules. D'après Marie, 2002.	42
Figure 19. Jonctions adhérentes formées par la liaison de 2 cadhérines [Stains and Civitelli, 2005].	43
Figure 20. Voies de signalisation sollicitées par les cadhérines dans les cellules ostéogéniques (A) [Mbalaviele et al., 2006] et endothéliales (B) [Wallez et al., 2006].	44
Figure 21. Jonctions communicantes entre cellules ostéogéniques [Civitelli, 2008].	45
Figure 22. Connexons et Connexines (Saez, 2003).	46
Figure 23. Voie de signalisation et jonctions gap [Civitelli, 2008].	47
Figure 24. Les sous-unités α et β d'intégrines [Siebers et al., 2005].	48
Figure 25. Les facteurs paracrines dans la communication ostéo-endothéliale [Wang et al., 1997].	49
Figure 26. Les différents isoformes du VEGF-A.	50
Figure 27. Voies de signalisation activées par le VEGF conduisant à différentes fonctions endothéliales: prolifération, survie, perméabilité ou migration [Cross et al., 2003].	51
Figure 28. Régulation de l'expression de facteurs ostéoblastiques par la voie de signalisation FGF/FGFR lors de l'ostéogenèse [Marie, 2003].	52

Figure 29. Co-culture en contact direct de cellules endothéliales et ostéoblastiques.	57
Figure 30. Communication cellulaire entre ostéoblastes et cellules endothéliales [Clarkin et al., 2007].	58
Figure 31. La vascularisation lors de l'ossification endochondrale [Kanczler and Oreffo, 2008].	61
Figure 32. Mécanismes sollicités dans la réparation tissulaire après lésion tissulaire ou implantation de biomatériaux, (d'après Charles Baquey, données personnelles).	63
Figure 33. Forces mécaniques dans l'environnement cellulaire [Rubin et al., 2006].	64
Figure 34. Les mécanorécepteurs des ostéoblastes [Rubin et al., 2006].	65
Figure 35. Les contraintes mécaniques appliquées aux ostéocytes, ostéoblastes et cellules souches mésenchymateuses [Robling et al., 2006].	66
Figure 36. Les principaux acteurs de l'ingénierie tissulaire [Topics in Tissue Engineering, Vol. 3, 2007. Eds. N Ashammakhi, R Reis & E Chiellini © 2007].	68
Figure 37. Les différentes modifications des matériaux afin de les rendre bioactifs [Guarino et al., 2007].	70
Figure 38. L'intérêt des bioréacteurs.	73
Figure 39. Les différents types de bioréacteurs décrits par Martin et al., 2004.	74
Figure 40. Les étapes de l'ingénierie tissulaire [Van Blitterswijk, 2008].	74
Figure 41. Schéma récapitulatif des objectifs de la thèse.	80
Figure 42. Morphologie pavimenteuse des cellules endothéliales.	83
Figure 43. Phénotype endothélial, exprimé par les HUVECs.	84
Figure 44. Principe de chambre à flux laminaire.	85
Figure 45. Morphologie « fibroblastique » des cellules ostéoprogénitrices (HOPs).....	86
Figure 46. Caractéristiques phénotypiques des HOPs.	86
Figure 47. Régulation de la β -caténine en co-culture HOPs/HUVECs.	136
Figure 48. Régulation des gènes codant pour des protéines impliquées dans la balance synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire en co-culture HOPs/HUVECs.	137
Figure 49. Régulation des gènes codant pour des protéines de coagulation impliquées dans le remodelage matriciel.	138
Figure 50. Modifications chimiques apportées à l'alginate et gélification, [Boontheekul et al., 2005; Drury et al., 2004; Rowley et al., 1999].	141

INTRODUCTION

Dans la première partie de cette revue bibliographique, nous décrivons la fonction et la structure du tissu osseux en détaillant plus particulièrement les éléments cellulaires qui le composent et les mécanismes de son remodelage.

La relation entre le tissu osseux et les vaisseaux sanguins fera l'objet de la seconde partie de cette revue bibliographique. En effet, les interactions qui existent entre les cellules osseuses et les types cellulaires des tissus environnants comme les vaisseaux sanguins sont essentielles à l'ostéogenèse et à la réparation osseuse.

Dans une troisième partie, nous nous attacherons à présenter les mécanismes de la réparation osseuse qu'elle soit naturelle ou guidée par des biomatériaux. Nous développerons plus particulièrement le concept de l'ingénierie tissulaire et ses principaux acteurs appliqués au tissu osseux.

I. Le tissu osseux

A. Fonctions du tissu osseux

Le tissu osseux revêt une importance capitale pour l'organisme tant sur le plan biomécanique que sur le plan métabolique. Il est le support mécanique essentiel du squelette, permet la locomotion et transmet les forces issues de la contraction musculaire d'une partie du corps à une autre pendant le mouvement. Il assure la protection des organes internes : le système nerveux central est protégé par la boîte crânienne et les vertèbres, tandis que le cœur et les poumons le sont grâce à la cage thoracique.

Il joue également un rôle extrêmement important dans le maintien de l'homéostasie phosphocalcique. En effet, notre squelette renferme environ 99 % du calcium et 90 % du phosphore de l'organisme. Le tissu osseux contribue ainsi à la régulation de la composition du fluide extracellulaire en calcium et phosphore.

Enfin, le tissu osseux assure une fonction hématopoïétique grâce à la présence de la moelle osseuse qui contient en particulier les cellules souches hématopoïétiques à l'origine des cellules sanguines et immunitaires.

Ce tissu conjonctif hautement spécialisé est un des seuls à être minéralisé, ce qui lui confère une certaine dureté et rigidité, bien qu'il ne soit pas pour autant « figé ». En effet, c'est une structure dynamique en perpétuel remaniement. Il est capable de s'autoréparer, d'adapter sa masse, sa forme et ses propriétés intrinsèques à des modifications d'ordre biomécanique et biochimique, de supporter une activité physique adéquate tout au long de la vie sans pour autant se fracturer ou être source de douleur.

B. Structure du tissu osseux

Le tissu osseux est composé à 70% d'une phase minérale et à 30% d'une phase organique, majoritairement constituée de collagène. Parmi les différents types d'os, on distingue les os longs comme le fémur, les os courts comme la clavicule et les os plats comme les os du crâne (Figure 1A).

Les os longs sont constitués de plusieurs parties. Les deux extrémités sont appelées épiphyses, la partie centrale est nommée la diaphyse et la jonction entre ces deux parties est la métaphyse (Figure 1B). La diaphyse se compose d'une cavité centrale occupée par la

moelle osseuse qui est tapissée d'une membrane appelée l'endoste. La diaphyse joue un rôle fondamental dans l'accroissement de l'os en épaisseur. Au niveau des métaphyses, se trouve la plaque de croissance, responsable de la croissance de l'os en longueur.

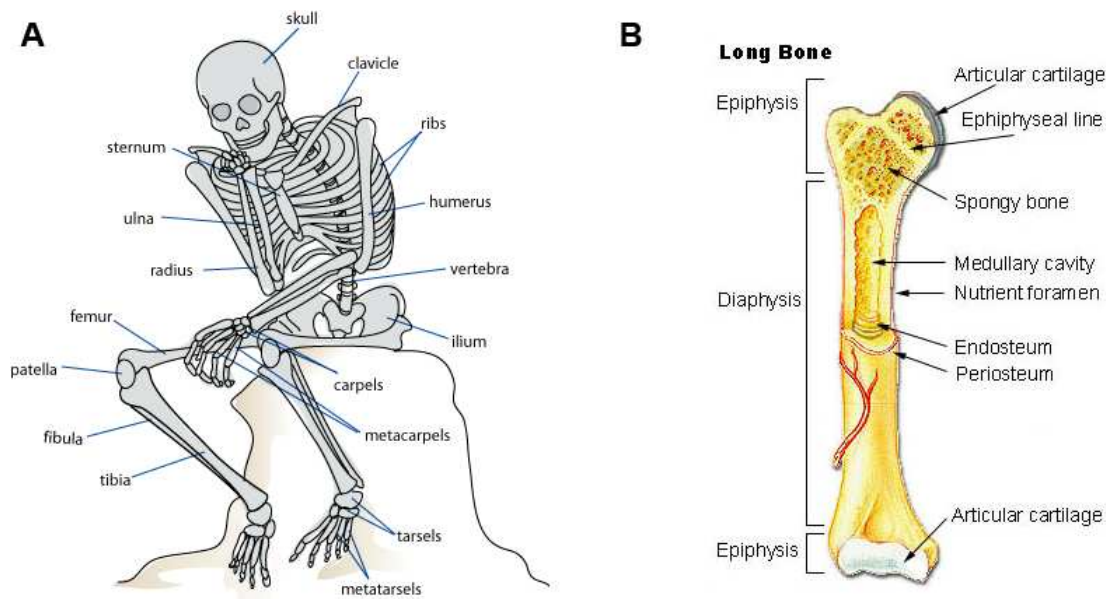


Figure 1. Le squelette humain (A) et la structure des os longs (B).

Chez l'adulte, la microstructure, l'organisation des fibres de collagène et du minéral osseux déterminent deux types d'os : l'os fibreux et l'os lamellaire. L'os fibreux est déposé très rapidement, il est caractéristique de l'os fœtal et des cals osseux qui se forment lors de la réparation de fractures. Ses fibres de collagène sont épaisses et sans organisation apparente. L'os fibreux est progressivement remplacé par de l'os lamellaire, particulièrement organisé. L'os lamellaire est constitué de couches successives de collagène disposées régulièrement. Son degré de minéralisation est plus faible mais son organisation générale lui confère des propriétés mécaniques supérieures à celles de l'os fibreux.

Au sein des différents os du squelette, on distingue deux types d'organisation différents : l'os cortical ou compact et l'os trabéculaire ou spongieux.

1) L'os cortical

L'os cortical ou os compact (Figure 2 [6]) est un os dense, poreux et constitué de matrice minéralisée. Il est organisé en structures cylindriques appelés ostéons (Figure 2 [4]) qui sont orientés selon l'axe principal de l'os. Les ostéons sont organisés autour des canaux de Havers (Figure 2 [8]), eux-même reliés entre eux par les canaux de Volkmann (Figure 2 [9]), où cheminent les vaisseaux nourriciers de l'os. Cette partie de l'os est responsable en particulier de la réception des stimuli mécaniques et de leur transmission vers l'os trabéculaire (Figure 2 [7]). L'os cortical est recouvert par le périoste (Figure 2 [5]), la paroi la plus externe des os.

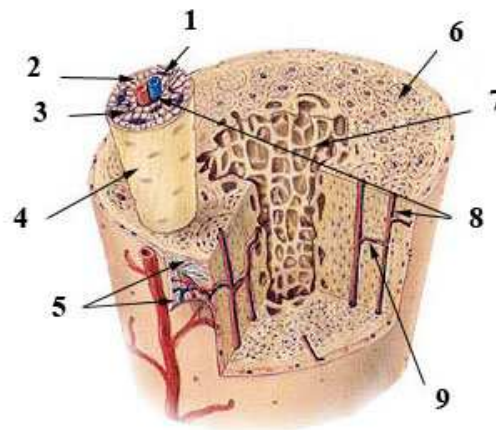


Figure 2. Les types d'os et leur organisation au sein des os longs.

1: ostéoplastes contenant les ostéocytes ; 2: lamelle ; 3: Canalicule ; 4: Ostéon ; 5: périoste ; 6: Os compact ; 7: Os trabéculaire ; 8: Canaux de Havers ; 9: Canaux de Volkman. D'après la thèse de Rouwkema J., 2007, Université de Twente, Pays-Bas.

2) L'os trabéculaire

L'os trabéculaire, ou os spongieux (Figure 2 [5]), est formé d'un réseau tridimensionnel de plaques osseuses reliées entre elles et dont l'orientation est générée par les forces mécaniques qui s'exercent sur l'os. La géométrie et la distribution des plaques confèrent à l'os trabéculaire résistance, flexibilité et une densité plus faible que celle de l'os cortical. L'os trabéculaire représente une surface d'échange considérable avec les liquides interstitiels, avec un renouvellement plus rapide que celui de l'os cortical, jouant ainsi un rôle majeur dans l'équilibre phosphocalcique. L'os trabéculaire est également le lieu principal de l'activité métabolique du tissu osseux où résident la majeure partie des cellules ostéogéniques. Ce type d'os est présent principalement au niveau des épiphyses des os longs, des os courts et dans les vertèbres.

C. Les éléments cellulaires

1) Les ostéoprogéniteurs

Il est aujourd'hui bien établi que la moelle osseuse est une des principales sources de cellules ostéoprogénitrices (bien qu'au cours de la réparation osseuse, les cellules ostéogéniques peuvent aussi provenir du périoste). La moelle osseuse est ainsi le siège de production de deux grands groupes de cellules progénitrices :

- les cellules souches hématopoïétiques qui vont donner naissance aux cellules sanguines et immunitaires (érythrocytes, lymphocytes, granulocytes, macrophages, monocytes, mégacaryocytes) ainsi que les cellules du lignage ostéoclastique (Figure 3).
- les cellules souches mésenchymateuses ou stromales qui sont à l'origine de la lignée ostéoformatrice (ostéoblastes et chondrocytes) et d'autres lignées progénitrices (fibroblastes, myoblastes, adipocytes et cellules endothéliales), selon les stimuli biochimiques et/ou mécaniques auxquels elles seront soumises (Figure 3).

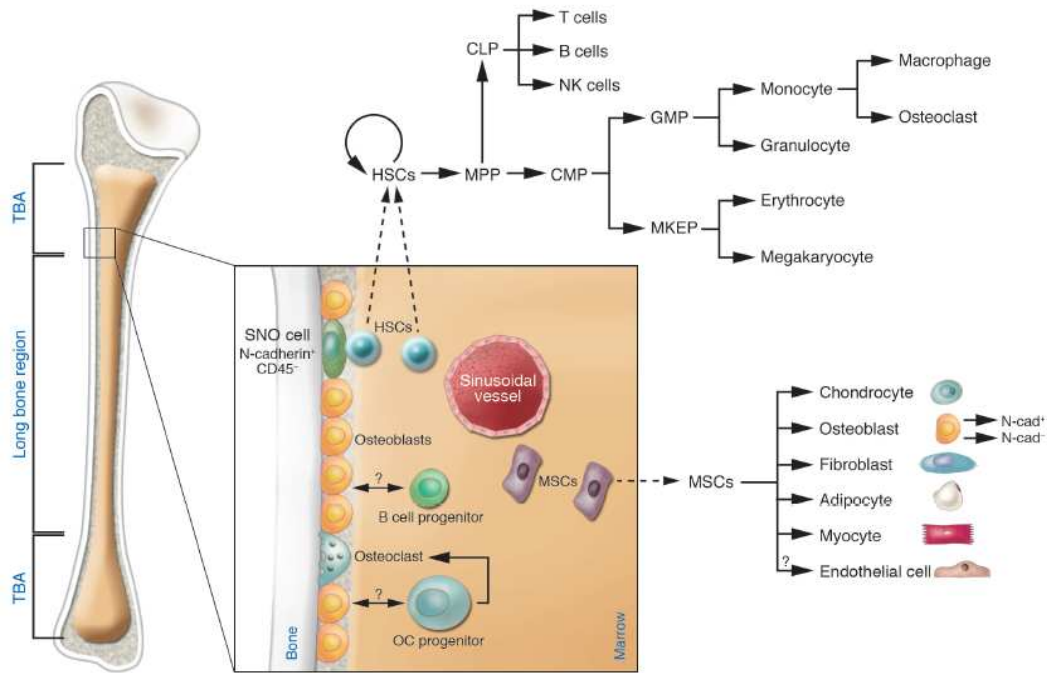


Figure 3. La différenciation des cellules souches de la moelle osseuse [Yin and Li, 2006].

HSCs : Hematopoietic Stem Cells (Cellules Souches Hématopoïétiques) ; MSCs : Mesenchymal Stem Cells (Cellules Souches Mésenchymateuses).

2) La lignée ostéoblastique

a) Les ostéoblastes

Les ostéoblastes (OB) dérivés de la différenciation des ostéoprogéniteurs, sont responsables de la formation osseuse. La maturation ostéoblastique requiert l'activation et/ou la suppression séquentielle de gènes codant pour des facteurs de transcription, des facteurs de croissance ou morphogénétiques et des marqueurs phénotypiques. Ceci explique que l'activité des facteurs de croissance dépend non seulement de leur concentration mais aussi du stade de différenciation des cellules sur lesquelles ils agissent. L'augmentation d'expression de protéines matricielles pendant la prolifération inhibe cette dernière et peut favoriser l'expression de marqueurs plus tardifs qui eux-mêmes stimulent la minéralisation (Figure 4).

A ces différentes étapes de maturation correspond l'expression séquentielle de marqueurs phénotypiques spécifiques tels que la phosphatase alcaline (PAL), le Collagène de type I (Col-I), la Bone SialoProtein (BSP) ou encore l'ostéocalcine (OC) (Figure 4).

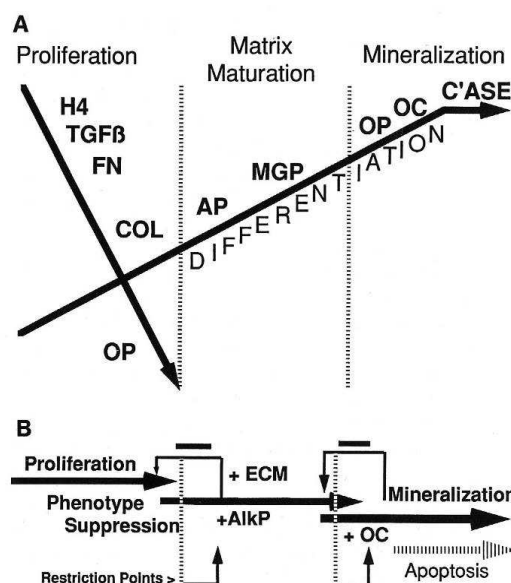


Figure 4. Expression des marqueurs ostéoblastiques au cours de la différenciation [Bilezikian et al., 1996].

H4: Histone H4 ; TGFβ: Transforming Growth Factor β ; FN: fibronectine ; COL: collagène ; OP: ostéopontine, AP (et AlkP): phosphatase alcaline ; MGP: protéine Gla-matricielle ; OC: ostéocalcine ; C'ASE: collagénase ; ECM: matrice extracellulaire.

Les facteurs de transcription, à savoir les effecteurs qui agissent selon un mode d'interaction protéine-ADN, jouent un rôle très important dans la différenciation ostéoblastique et dans le développement du tissu osseux. On note dans un premier temps, l'activation du gène codant pour le facteur de transcription Cbfa1/Runx2 (Core-binding factor A1 / Runt-related transcription Factor-2) qui induit l'engagement des cellules mésenchymateuses vers le lignage ostéoblastique (Figure 5). Le taux d'expression de Cbfa1/Runx2 dépend de l'expression de facteurs locaux tels que les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) [Edgar et al., 2005; Prince et al., 2001; Takazawa et al., 2000] et est régulé par la voie des Smads [Bae et al., 2007; Javed et al., 2008]. L'absence totale d'expression de Cbfa1/Runx2 conduit à une inhibition d'ossification [Yamaoka et al., 2006], à une maturation chondrocytaire altérée [Enomoto et al., 2000], et à une prolifération adipocytaire [Kobayashi et al., 2000]. Les cellules stimulées par le facteur Cbfa1/Runx2 sont considérées comme des cellules ostéoprogénitrices ou pré-ostéoblastes mais ne sont pas considérées comme des ostéoblastes matures (Figure 5). Elles n'expriment pas ou très peu la PAL qui est un des marqueurs précoces de la différenciation ostéoblastique [Gordeladze et al., 2008].

Ostérix est un autre facteur de transcription indispensable à la différenciation ostéoblastique et au développement osseux [Nakashima et al., 2002]. Osterix, en partie sous la dépendance des BMPs, agirait en aval de Cbfa1/Runx2, principalement sur la différenciation terminale des ostéoblastes, distinguant ainsi la voie ostéogénique de la voie chondrogénique. Récemment, il a été montré que Osterix pourrait également être régulé par la BMP2 et le gène homéotique Msx2 et agirait indépendamment de l'activité de Cbfa1/Runx2 [Matsubara et al., 2008].

Puis, sous l'action du gène homéotique Msx2, les pré-ostéoblastes vont entrer dans une phase de prolifération, marquée notamment par la synthèse d'histone H4 [Shirakabe et al.,

2001]. Le gène homéotique *Dlx-5* stimulerait la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes et la production de protéines d'adhésion comme la fibronectine et le collagène de type I [Ryoo et al., 2006]. C'est aussi à ce stade que les pré-ostéoblastes vont synthétiser le TGF β (Transforming Growth Factor beta), la BSP ou encore la BMP2.

Au cours de cette phase, on assiste à une augmentation de l'expression et de l'activité de la PAL. La matrice extracellulaire correspond alors à un tissu ostéoïde et le processus de calcification s'effectue en une dizaine de jours.

Pendant la phase de maturation de la matrice, la stimulation de l'expression de *Cbfa1/Runx2* est régulée par le TGF β et la BMP2 [Marie, 2008]. *Cbfa1/Runx2* va alors activer la transcription de plusieurs gènes et notamment celui de l'ostéocalcine par sa liaison à OSE2 (osteoblast Specific cis-acting element 2), séquence présente sur le promoteur du gène de l'ostéocalcine.

La synthèse d'ostéocalcine est associée à l'étape de minéralisation de la matrice osseuse. Cette phase se traduit par l'expression d'autres protéines matricielles liées au phénotype ostéoblastique mais sans en être spécifiques: l'ostéopontine ou encore l'ostéonectine. Au cours de cette étape, les ostéoblastes acquièrent un caractère différencié correspondant à une diminution de l'activité de la PAL et une forte expression de l'ostéocalcine.

Les ostéoblastes vont alors évoluer, soit vers la formation cellules bordantes ou d'ostéocytes, soit vers la voie de l'apoptose.

La Figure 5 résume les différentes étapes de cette différenciation ostéoblastique.

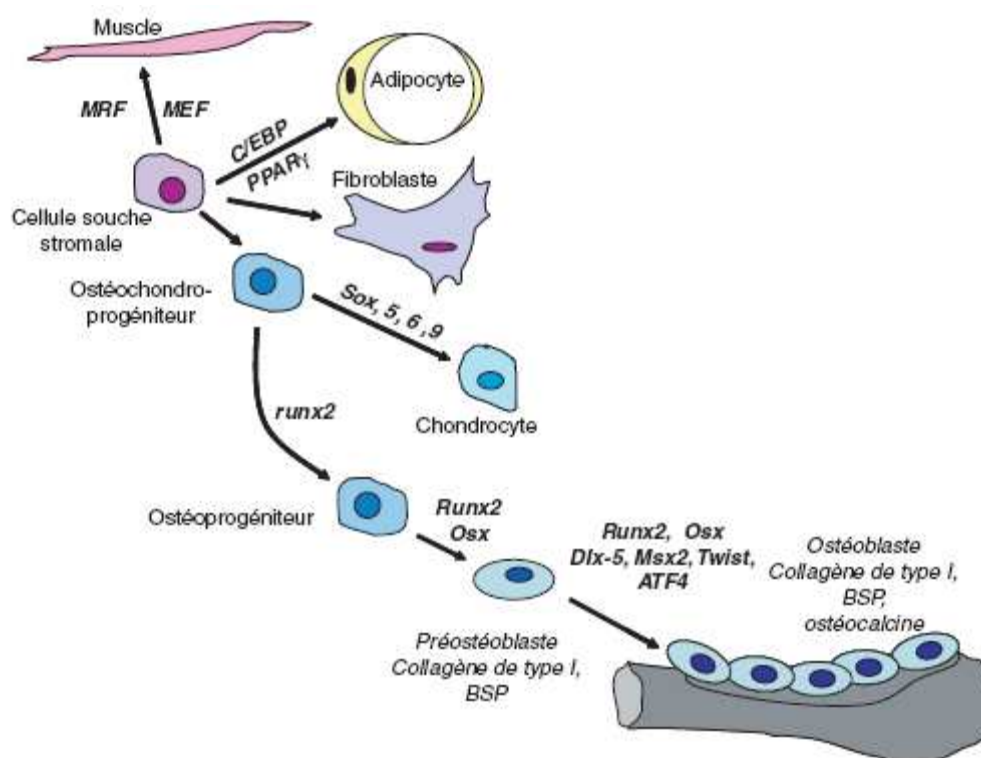


Figure 5. Différenciation des cellules stromales en cellules ostéoblastiques [Thomas et al., 2008].

D'un point de vue histologique, les ostéoblastes ne fonctionnent pas de manière isolée, ils sont toujours organisés en groupes cellulaires étroitement intriqués (100 à 400 cellules par site de formation osseuse), bordant la matrice qu'ils élaborent avant qu'elle soit calcifiée. De façon plus précise, des complexes jonctionnels sont souvent présents entre les ostéoblastes et ceux-ci jouent un rôle majeur dans le processus de différenciation ostéoblastique. En effet, les jonctions communicantes (de type « gap ») permettent le passage de messagers secondaires qui eux-mêmes peuvent réguler l'expression de gènes spécifiques du phénotype ostéoblastique (OC et BSP notamment) [Lecanda et al., 1998].

b) Les cellules bordantes

Les ostéoblastes peuvent s'allonger et former une couche cellulaire alignée le long des surfaces osseuses inactives, c'est-à-dire sans ostéogenèse ni ostéoclasie, ces cellules sont appelées les cellules bordantes. Ces cellules émettent des prolongements cytoplasmiques qui établissent des contacts avec les ostéocytes superficiels. Elles sont unies entre elles et aux ostéocytes par des systèmes jonctionnels de type « gap ».

Les cellules bordantes se comportent comme une barrière fonctionnelle entre la moelle osseuse et l'os calcifié. Elles jouent un rôle déterminant dans la modulation de l'activité ostéoclastique, plus particulièrement lors de l'activité des unités métaboliques osseuses où elles libèrent des substances chimiotactiques reconnues par les précurseurs ostéoclastiques. La résorption de l'os assurée par les ostéoclastes serait en partie facilitée par les rétractations cytoplasmiques de ces cellules bordantes et par la sécrétion de collagénases, sous l'action de certaines hormones comme la vitamine D (principalement son métabolite actif $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) ou la PTH (Hormone ParaThyroïdienne).

Les cellules bordantes constituent également une source de cellules ostéoblastiques de réserve: sous l'action de différents stimuli comme la PTH, elles sont capables de se comporter en ostéoblastes actifs.

c) Les ostéocytes

Les ostéocytes sont des cellules osseuses matures, dérivant d'une différenciation terminale de 10 à 20% des ostéoblastes et qui sont emmurées dans la matrice minéralisée au sein de logettes appelées « ostéoplastes ».

De fins prolongements cellulaires permettent aux ostéocytes d'être reliés entre eux et aux cellules de la surface de la travée osseuse par le biais de jonctions communicantes (Figure 6). Ce réseau leur permet de transmettre les variations des stimulations mécaniques et biochimiques qui influencent leur métabolisme [Civitelli, 2008]. Les contraintes mécaniques sont transmises de la partie corticale vers la partie trabéculaire où résident les activités métaboliques. Les substances nutritives qui proviennent du sang atteignent l'ostéocyte en diffusant, soit dans les canalicules autour des prolongements cellulaires, soit dans la cellule elle-même, passant de l'une à l'autre par ces mêmes jonctions communicantes.

Ces cellules ont une activité métabolique très faible mais sont capables de synthétiser du collagène de type I qui sera minéralisé secondairement.

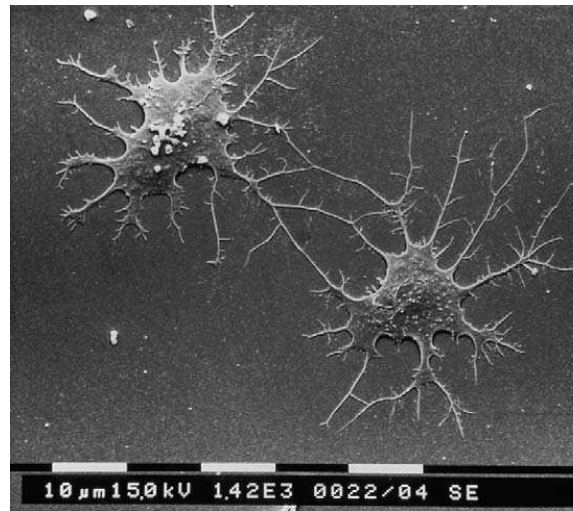


Figure 6. Ostéocytes en culture, reliés entre eux par leurs prolongements cytoplasmiques [Klein-Nulend et al., 2005].

3) La lignée ostéoclastique

La lignée ostéoclastique dérive de précurseurs circulants, apparentés à la lignée monocytaire, qui colonisent la moelle osseuse, et se différencient au contact des cellules stromales pré-ostéoblastiques. Les pré-ostéoclastes mononucléés fusionnent pour former des ostéoclastes matures multinucléés. La différenciation des pro-monocytes en ostéoclastes se fait sous l'influence de différents facteurs de transcription (c-fos, NF-κB) et de facteurs de croissance dont les principaux sont indiqués dans la Figure 7.

Le « macrophage colony stimulating factor » (M-CSF) qui se lie à son récepteur (c-fms) agit précocement dans la différenciation et entraîne l'engagement des cellules dans la lignée ostéoclastique. Le « receptor activating NF-κB Ligand » (RANKL), porté par la membrane des ostéoblastes ou des cellules stromales, se lie à son récepteur RANK et stimule la différenciation des pré-ostéoclastes en activant leur fusion et l'activité de résorption. L'ostéoprotégérine (OPG), synthétisée par les ostéoblastes, est un récepteur soluble qui a la capacité de prévenir la différenciation et la maturation des ostéoclastes en se fixant au RANKL, liaison qui va inhiber la reconnaissance RANK-RANKL et [Troen, 2003].

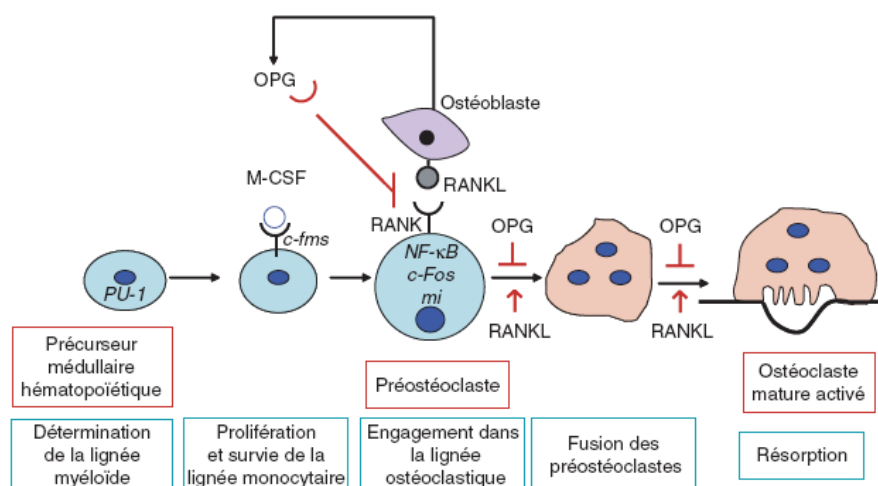


Figure 7. Différenciation des cellules ostéoclastiques [Thomas et al., 2008].

Les ostéoclastes matures sont des cellules géantes d'environ 100 µm de diamètre et multinucléées. L'acquisition d'une bipolarité phénotypique et fonctionnelle est ensuite essentielle à la fonction de résorption osseuse de l'ostéoclaste (Figure 8). Les noyaux se trouvent à l'opposé de la surface osseuse tandis que la zone en contact avec la matrice osseuse développe des dendrites qui, d'une part, augmentent la surface de contact entre l'ostéoclaste et le tissu osseux et, d'autre part, confinent les changements de pH à une zone bien précise. L'ostéoclaste libère ensuite de nombreuses enzymes lysosomiales par exocytose dans la lumière située entre la surface osseuse et la membrane plissée ostéoclastique. Le pH acide (environ pH 4) dû à la sécrétion d'acides organiques tels que des citrates et des lactates par l'ostéoclaste, favorise l'activité des enzymes hydrolases lysosomiales, comme la Phosphatase Acide Tartrate Résistante (TRAP), la cathepsine K et l'activité des métalloprotéases matricielles (MMPs) qui vont pouvoir dégrader la matrice collagénique. L'os résorbé laisse alors peu à peu la place à une lacune de résorption appelée « lacune de Howship ». Les produits de dégradation du collagène de type I sont transportés et libérés dans le milieu extracellulaire grâce au trafic vésiculaire à travers la cellule.

La différenciation et l'activité des ostéoclastes sont régulées par des facteurs sécrétés par les ostéoblastes mais l'influence des cellules endothéliales vasculaires est tout aussi essentielle, bien que moins connue. Il a été démontré récemment que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) pourrait stimuler la survie, la différenciation mais aussi l'activité des ostéoclastes [Yang et al., 2008; Zhang et al., 2008].

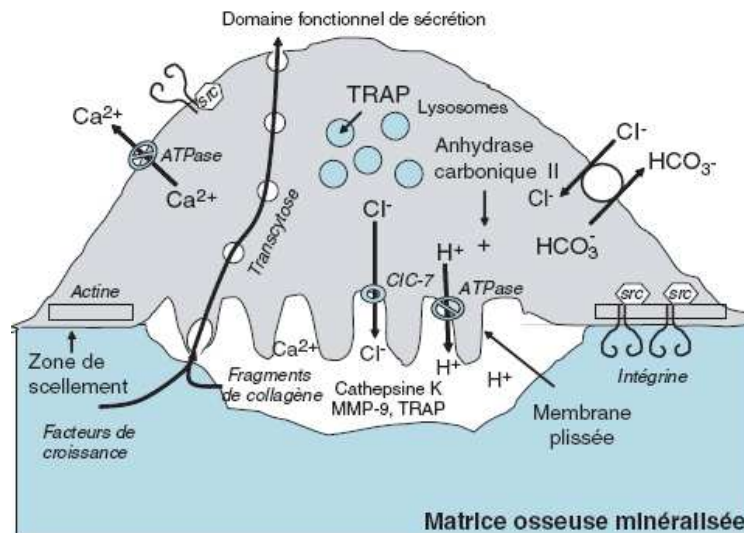


Figure 8. La résorption de la matrice osseuse par les ostéoclastes [Thomas et al., 2008].

D. La matrice extracellulaire et le remodelage osseux

1) La matrice extracellulaire

Ce sont les ostéoblastes qui synthétisent la matrice osseuse et régulent sa minéralisation. Cette matrice a la particularité d'être minéralisée et d'être constamment régénérée au cours de la vie par un couplage résorption/formation étroitement régulé. La matrice extracellulaire (MEC) occupe environ 90% du volume tissulaire et elle est composée de deux fractions : une phase minérale constituée de cristaux d'hydroxyapatite, liée à une phase organique constituée principalement de collagène de type I (Figure 9).

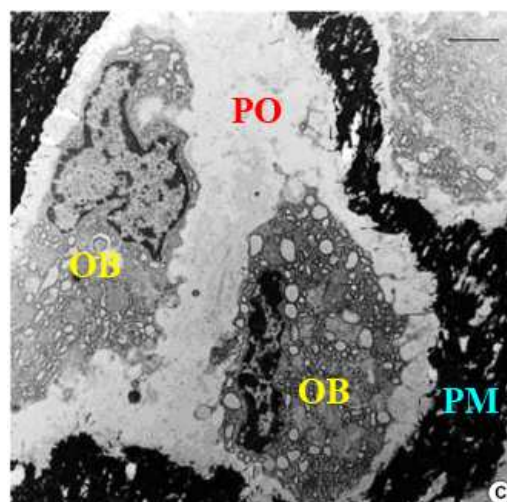


Figure 9. Deux ostéoblastes (OB) entourés de la matrice extracellulaire composée des deux phases : organique (PO) et minérale (PM) [Choi et al., 2002].

La barre d'échelle représente 2 µm.

a) La phase minérale

La phase minérale est constituée d'un cristal de phosphate de calcium complexe qui se dépose à l'intérieur des fibres de collagène de façon ordonnée. Le principal constituant de la substance minérale des tissus calcifiés est l'hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ associée sous forme indéterminée à du carbonate de calcium.

Le dépôt de la phase minérale des tissus calcifiés dans l'os est un phénomène biologique incluant une série de processus physico-chimiques complexes accompagnés de réactions biochimiques. Ce phénomène est dirigé par les cellules osseuses et par les interactions entre la phase minérale et la phase organique de la MEC. Certains constituants de la matrice, comme le collagène, semblent contrôler la formation du cristal initial (nucléation) et/ou réguler la taille, la morphologie et l'orientation des cristaux (croissance et multiplication). La matrice agit ainsi comme agent de nucléation du cristal et comme support servant à l'organisation de ces dépôts minéraux.

b) La phase organique

Le tableau 1 représente la composition de la phase organique de la MEC osseuse.

- *Les protéines collagéniques*

Les protéines collagéniques sont les constituants majeurs de la matrice extracellulaire. Une chaîne de collagène se caractérise par la présence dans sa séquence de répétitions du motif Gly-X-Y, dans lequel un tiers environ des X sont des prolines et un tiers des Y des hydroxyprolines, acide aminé spécifique des collagènes (Figure 10 A). Ce motif permet à 3 chaînes de s'associer en triple hélice, grâce à la répétition régulière des glycines et à l'action stabilisante des hydroxyprolines.

La molécule de collagène de type I, prépondérante dans la MEC osseuse (Tableau 1), est constituée d'une triple hélice correspondant à un enchevêtrement de deux chaînes identiques $\alpha 1$ et d'une chaîne $\alpha 2$ (Figure 10 B).

Les molécules s'alignent ensuite dans la matrice extracellulaire, l'extrémité C-terminale contre l'extrémité N-terminale, pour constituer des fibres, séparées par un espace d'environ 45 nm, et décalées par rapport à leurs voisines d'environ 1/4 de leur longueur (Figure 10 C). Il se constitue ainsi au sein des fibres, des « vides » qui fixent les métaux lourds et expliquent l'aspect strié caractéristique des collagènes fibrillaires en microscopie électronique. Ces « vides » jouent un rôle très important dans la minéralisation de la matrice osseuse, comme site de nucléation des premiers cristaux d'hydroxyapatite. Le collagène de type I est dit fibrillaire, il est organisé en fibres au sein de la matrice extracellulaire (Figure 10 D).

Les chaînes α du collagène subissent des modifications post-traductionnelles qui caractérisent le collagène du tissu osseux comparativement à celui des tissus conjonctifs non minéralisés. Ces modifications peuvent être des hydroxylations, des glycosylations ou encore la formation de liaisons covalentes inter et/ou intra-caténares. Ces différentes modifications confèrent au collagène de type I des propriétés physiques et biologiques qui sont spécifiques du tissu osseux [Lammi et al., 2006].

jouer un rôle dans la minéralisation due à la haute affinité du résidu « Gla » pour le calcium. Une fois sécrétée par l'ostéoblaste, l'ostéocalcine est incorporée à la matrice osseuse, mais une fraction de celle-ci passe dans la circulation sanguine et peut être utilisée comme indice de la formation osseuse [Garnero et al., 2000; Thomas et al., 2008]. Cependant, il a été montré que des souris transgéniques dont le gène codant pour l'ostéocalcine a été invalidé, présentent une augmentation progressive de la masse osseuse [Ducy et al., 1996]. Ce travail confère ainsi d'autres propriétés biologiques à l'ostéocalcine telles que la régulation de la maturation ostéoblastique et du remodelage osseux.

Les glycophosphoprotéines, comme l'ostéonectine, présentent une forte affinité pour l'hydroxyapatite et le calcium ainsi que pour le collagène de type I mais elle n'est pas spécifique de l'os. Elle semble jouer un rôle important dans la croissance et la prolifération ostéoblastique, ainsi que dans la minéralisation de la MEC car elle est un puissant inhibiteur de la formation des cristaux d'hydroxyapatite.

Une autre caractéristique du tissu osseux est de synthétiser de grandes quantités de phosphatase alcaline, une autre glycoprotéine. Cette enzyme, initialement liée à la membrane plasmique, peut être clivée et se retrouver dans la matrice minéralisée, lieu probable de son action. Il semble que son rôle soit prépondérant dans le processus de minéralisation. En effet, elle permet de concentrer les ions phosphates par hydrolyse de substrats organiques phosphorylés, ainsi que des pyrophosphates qui agissent comme des inhibiteurs de la minéralisation. Enfin, elle facilite le transport du phosphore par son activité phosphotransférase.

Dans la MEC osseuse, il existe aussi des protéines contenant dans leur séquence peptidique des motifs tels que le motif RGD (Arg-Gly-Asp), séquence consensus permettant l'adhésion cellulaire. Ces protéines interagissent directement avec les récepteurs membranaires appelés intégrines et sont susceptibles de transmettre des signaux de la MEC vers la cellule grâce à leur connexion aux protéines du cytosquelette. La fibronectine et la famille des Sialoprotéines (la Bone Sialoprotein I étant l'ostéopontine) font parties de ces protéines d'adhésion. Ces protéines ne sont pas spécifiques du tissu osseux mais ont une influence sur l'activité des cellules ostéogéniques. A titre d'exemple, l'ostéopontine joue un rôle dans la différenciation ostéoblastique en étant étroitement corrélée à l'initiation de la minéralisation [Gordon et al., 2007; Nanci, 1999]. Par leur liaison aux intégrines, les BSP peuvent aussi réguler la migration des cellules pré-ostéoblastiques [Karadag and Fisher, 2006].

La MEC osseuse possède également plusieurs membres de la famille des protéoglycanes tels que le versicane ou le hyaluronate [Velleman, 2000]. Lors de l'embryogenèse, ces substances permettent de délimiter des zones qui seront minéralisées au cours des premières étapes du processus d'ossification.

Les protéines plasmatiques et les différents facteurs de croissance sont séquestrés dans la matrice osseuse et ne représentent que 2 à 4% des protéines totales de la matrice. Cependant, les facteurs de croissance comme le TGF β , le VEGF, le bFGF ou encore l'IGF ont la capacité de réguler le remodelage osseux lorsqu'ils sont libérés (voir paragraphe I.D.2.b.).

Fraction collagénique osseuse	
Collagène de type I	90%
Les protéines non-collagéniques osseuses	
Ostéocalcine	1,5 - 2,5%
Autres Gla-protéines matricielles	0,2%
Ostéonectine	1,5 - 2,5%
Autres Phosphoprotéines	0,9%
Sialoprotéines (BSP, Ostéopontine)	1%
Protéoglycanes	0,4%
Les protéines plasmatiques	
Alpha2 HS et glycoprotéines	0,5 - 1%
Albumine	0,3%
Immunoglobulines	< 0,1%
Autres	2 - 3%
Facteurs de croissance	<1%

Tableau 1. Composition de la matrice organique du tissu osseux en % du poids total des protéines osseuses (modifié à partir de Thomas et al., 2008).

2) Le remodelage osseux

a) Le cycle du remodelage osseux

Le tissu osseux est un tissu dynamique, il est sans cesse remanié par un mécanisme associant étroitement les phénomènes de résorption et de formation. Ce remaniement intervient au cours de l'ostéogenèse, lors de la réparation de fracture ou tout au long de la vie. Ce remaniement permet en particulier au tissu osseux de s'adapter et de modifier sa structure en fonction des contraintes mécaniques et/ou biochimiques environnantes.

Le remodelage du tissu osseux a lieu sur la totalité du squelette mais chaque unité de remodelage est spatialement et chronologiquement isolée des autres unités. Ceci suggère que l'activation des événements cellulaires responsables du remodelage est contrôlée en partie, par des mécanismes issus du microenvironnement osseux. Plus particulièrement, les cellules impliquées dans le remodelage osseux et présentes au niveau des surfaces osseuses résorbées sont en contact étroit avec les cellules de la cavité médullaire, qui produisent de nombreuses cytokines et facteurs de croissance au potentiel ostéotrope. L'activité des cellules est également contrôlée par des facteurs systémiques telles que la PTH et la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Bien que la structure et la fonction de l'os cortical diffèrent de celles de l'os spongieux, le remodelage obéit aux mêmes principes biologiques. Il existe une balance très régulée entre formation et dégradation osseuses assurées respectivement par les ostéoblastes et les ostéoclastes (Figure 11). Lors de la résorption osseuse, les cellules souches ostéoclastiques sont recrutées et se différencient en ostéoclastes matures. La sécrétion d'enzymes comme la Phosphatase Acide Tartrate Résistante (TRAP) permet une dégradation osseuse efficace en résorbant le calcium de la matrice extracellulaire. Puis, les ostéoclastes reçoivent un signal inhibiteur, leurs prolongements dendritiques se rétractent et l'étape de réversion débute. Les cellules pré-ostéoblastiques sont alors mobilisées et se différencient en ostéoblastes matures qui assurent la formation de l'os en déposant une matrice qui sera minéralisée par les ostéocytes.

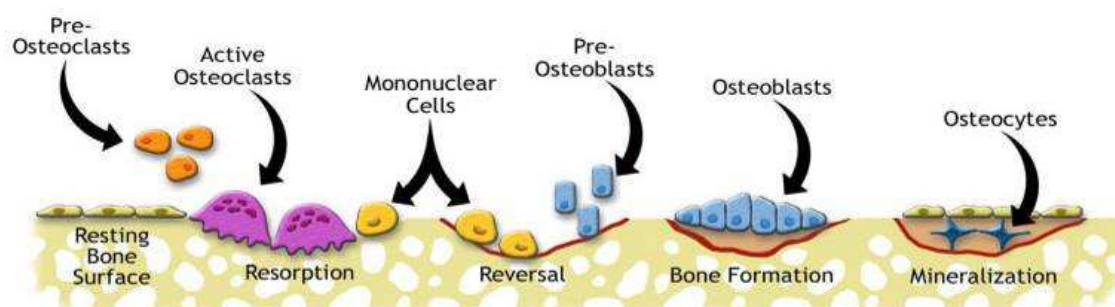


Figure 11. Cycle du remodelage osseux, (Université de Michigan, <http://www.umich.edu/>).

Le remodelage osseux est ainsi un processus complexe faisant intervenir de nombreuses fonctions cellulaires orientées vers la coordination de la résorption et de la néoformation osseuse. Ces fonctions cellulaires et leur coordination sont elles-mêmes sous la dépendance de facteurs locaux, de facteurs systémiques et de facteurs mécaniques agissant principalement au niveau des lignées ostéoclastiques et ostéoblastiques.

b) La régulation du remodelage osseux

• Les facteurs locaux

Les facteurs locaux sont essentiellement produits par les ostéoblastes et les cellules du micro-environnement osseux.

Un des éléments essentiels de ce couplage entre formation et résorption est constitué par le complexe RANK/RANKL. Comme il l'a été détaillé précédemment, les ostéoblastes sont nécessaires à la régulation de la différenciation ostéoclastique en sécrétant le RANKL et l'OPG. En effet, en se fixant à son récepteur RANK, le RANKL est un puissant activateur de la différenciation et de l'activité des ostéoclastes et donc de la résorption osseuse. À l'opposé, l'OPG se lie au RANKL, empêche toute liaison avec son récepteur et inhibe la différenciation ostéoclastique. Le système RANKL/OPG, médiateur de cette communication entre ostéoblastes et ostéoclastes, exerce un rôle fondamental dans la régulation de l'ostéoclastogénèse et dans le remaniement osseux.

De même, de multiples facteurs qui sont séquestrés dans la MEC peuvent stimuler de manière rapide la formation osseuse lorsque les ostéoclastes sont en train de la dégrader. C'est le cas des facteurs de croissance tels que des protéines de la superfamille du TGF- β , les BMPs, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) ou encore l'IGF (Insulin-like Growth Factor). Ces facteurs, liés à la matrice par leur capacité à se fixer à l'héparine, peuvent être libérés lors de la résorption de la matrice sous l'action des MMPs.

Ces dernières sont capables de dégrader les composants de la MEC mais aussi des molécules non-matricielle [Kusano et al., 1998]. De ce fait, les MMPs participent à plusieurs fonctions cellulaires : (1) elles dégradent la MEC et permet la migration des cellules ; (2) elles altèrent le microenvironnement matriciel et modifient le comportement des cellules ; (3) elles régulent l'activité d'autres protéases; (4) elles participent à des fonctions cellulaires comme l'adhésion, la prolifération ou l'apoptose et (5) elles modulent l'activité biologique de molécules en les clivant et les libérant de la MEC. Après leur sécrétion, les MMPs peuvent cliver la liaison à l'héparine qui existe entre la MEC et les molécules séquestrées, et entraîner leur libération. L'activité des MMPs est régulée par les TIMPs (Tissue Inhibitor Metalloproteinases) qui ont une fonction inhibitrice des MMPs. Dans le tissu osseux, il a été montré que les MMP9 et MMP13 sont des régulateurs clés du remodelage osseux qui coordonnent la dégradation de la MEC mais permettent aussi le recrutement de cellules souches et leur différenciation en cellules ostéogéniques et endothéliales [Ortega et al., 2003].

Le TGF β constitue l'un des facteurs de croissance le plus abondamment stocké dans la matrice osseuse. Une fois libéré et clivé, il devient actif et, par ses propriétés chimiotactiques, il est capable de recruter différents types cellulaires au site de réparation comme les précurseurs ostéoblastiques ou encore les cellules endothéliales [Kanaan and Kanaan, 2006; Lebrin et al., 2005]. Il peut avoir un effet inhibiteur de l'activité des ostéoclastes et stimulateur de la fonction ostéoblastique. Ces différentes fonctions seront développées dans le paragraphe II.B.2.c.

Les protéines morphogéniques BMPs, appartenant à la superfamille des TGF β , sont sécrétées par les cellules, séquestrées dans la MEC liées à l'héparine et sont à l'origine d'une stimulation de formation osseuse dès leur libération [Grunert et al., 2007; Ryoo et al., 2006]. Une fois clivés par les MMPs, les BMPs sont sous forme soluble et peuvent alors interagir avec leur récepteur et activer les voies de signalisation qui leur sont spécifiques. Les BMP2, BMP4, BMP6, BMP7 et BMP9 sont les principaux agents capables d'induire la différenciation des cellules mésenchymateuses vers la lignée ostéoblastique. L'activité des BMPs est contrôlée par différents inhibiteurs tels que des antagonistes comme Noggin ou la Sclérotine qui peuvent limiter la présence des BMPs solubles par séquestration dans la matrice extracellulaire ou en régulant l'induction du signal intracellulaire [ten Dijke, 2006]. Les récepteurs aux BMPs sont des protéines kinases qui se dimérisent lors de la liaison avec leur ligand (Figure 12). Le récepteur BMPRII va ensuite phosphoryler les protéines Smad-R (mothers against decapentaplegic homolog – receptor regulated) qui peuvent être Smad1, 5 ou 8. Puis, Smad4 qui est une Co-Smad (common mediator-Smad) va permettre la translocation au noyau du complexe. La transcription des gènes codant pour des protéines ostéoblastiques telles que la PAL, le collagène de type I ou l'ostéocalcine peuvent être alors activées [Ryoo et al., 2006]. Les BMPs ont aussi d'autres rôles biologiques, plus

particulièrement dans l'angiogenèse. De façon plus précise, des mutations dans le gène codant pour la BMP2 entraîne une perte de la vascularisation osseuse par induction de l'apoptose des progéniteurs endothéliaux [Teichert-Kuliszewska et al., 2006].

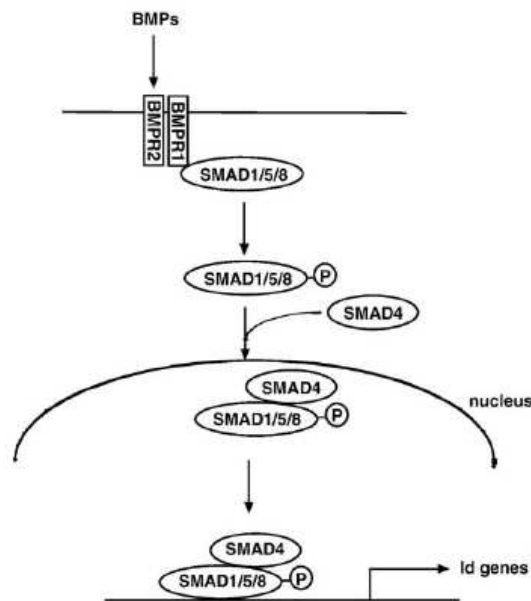


Figure 12. Voie de signalisation induite par les BMPs lors de la stimulation de la différenciation ostéoblastique [Abe, 2006].

Le facteur de croissance épidermique (Epithelial Growth Factors, EGF) peut induire la prolifération des progéniteurs ostéoblastiques mais inhibe la synthèse de collagène de type I par les ostéoblastes matures [Thomas et al., 2008]. Il peut aussi stimuler la synthèse de prostaglandines, dont la prostaglandine E2 (PGE2).

La PGE2, principale prostaglandine synthétisée par les ostéoblastes, a une double action sur le métabolisme osseux, par son effet stimulateur ou inhibiteur de la formation et de la résorption osseuses selon la dose et le mode d'administration. De façon plus précise, administrées par voie locale, les prostaglandines augmentent la formation périostée et la vascularisation.

Comme les prostaglandines, les leucotriènes sont associés à la résorption osseuse ostéoclastique. Ces dérivés de l'acide arachidonique, sous l'action de la 5-lipoxygénase, activent les ostéoclastes *in vitro*.

Les cellules stromales engagées dans la différenciation ostéoblastique sont également la principale source de « colony-stimulating-factor » (CSF), puissant stimulant de la différenciation ostéoclastique et donc de la résorption osseuse.

Le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), synthétisé par de nombreux types cellulaires, est un dimère codé par deux gènes différents, le PDGF-A et le PDGF-B. Ainsi le polypeptide peut exister sous la forme d'un homodimère PDGF-AA ou PDGF-BB, ou sous la forme d'un hétérodimère: PDGF-AB. Les ostéoblastes peuvent synthétiser toutes les isoformes de PDGF puisqu'ils expriment les deux gènes. Le PDGF stimule la résorption osseuse en augmentant le nombre d'ostéoclastes et en induisant l'expression de la MMP-13 par les ostéoblastes.

Si le VEGF joue un rôle central dans le couplage entre les ostéoblastes et les cellules endothéliales, il peut exercer également un effet sur la fonction ostéoclastique. Les ostéoclastes expriment les récepteurs du VEGF, et cette cytokine pourrait augmenter leur activité de résorption de la matrice osseuse. Le VEGF pourrait donc être au cœur de la régulation du remodelage osseux puisque les ostéoblastes synthétisent cette cytokine [Mayer et al., 2005; Villars et al., 2000]. Gerber et al. ont montré que les chondrocytes hypertrophiques synthétisent des taux élevés de VEGF, ce qui aurait pour effet, non seulement de favoriser l'invasion capillaire du cartilage calcifié, mais également de stimuler l'activité chondroclastique et ostéoclastique [Gerber et al., 1999]. Le VEGF pourrait occuper une position centrale dans la communication intercellulaire, entre ostéoblastes et ostéoclastes, mais aussi entre ostéoblaste et cellules endothéliales (voir paragraphe II.B.2.c.).

Les facteurs de croissance tels que les IGFs (Insulin-like Growth Factor), les FGFs (Fibroblast Growth Factor) exercent aussi un rôle très important dans le remodelage osseux en stimulant la prolifération et la différenciation cellulaire et jouent un rôle essentiel dans la relation entre l'angiogenèse et l'ostéogenèse. L'action de ces facteurs sera détaillée dans le paragraphe II.B.2.c.

La voie de signalisation Wnt joue également un rôle fondamental dans le développement et le maintien de nombreux tissus dont le tissu osseux [Krishnan et al., 2006]. La liaison de Wnt à son récepteur Frizzled, associé à son co-récepteur LRP5 (Low-density lipoprotein (LDL)-Receptor-related Protein 5), entraîne la translocation au noyau de la β -caténine [Glass and Karsenty, 2007] qui va alors induire la transcription de gènes cibles. Par cette activation, la voie Wnt stimule l'expression de facteurs spécifiques du phénotype ostéoblastique tels que Cbfa1/Runx2, Ostérix, la PAL [Rodda and McMahon, 2006] ou encore l'ostéocalcine [Matsuzaki et al., 2006].

Mais d'autres facteurs peuvent intervenir sur le remodelage osseux comme les activateurs du plasminogène tPA et uPA (tissue Plasminogen Activator et urokinase Plasminogen Activator). En induisant la synthèse de la plasmine, ils stimulent la dégradation de la matrice extracellulaire. Ainsi, une inhibition de ces deux facteurs entraîne une augmentation de la masse osseuse [Daci et al., 2003].

• *Les facteurs systémiques*

Parmi ces facteurs, les hormones calcitropes jouent un rôle essentiel dans le remaniement osseux. Lors d'une baisse de la calcémie, c'est-à-dire une baisse de la concentration en calcium dans l'organisme, la PTH est sécrétée et va se fixer à ses récepteurs présents sur les ostéoblastes. En réponse à la PTH, les ostéoblastes peuvent libérer le RANKL qui va alors stimuler la différenciation ostéoclastique, la résorption osseuse permettant ainsi la libération de calcium [Gennero et al., 2004]. En cas d'hypocalcémie prolongée, la PTH stimule aussi l'hydroxylation de la vitamine D qui va donner naissance au 1,25 dihydroxy-cholécalciférol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) la forme active de la vitamine D.

Ce métabolite actif de la vitamine D est capable de stimuler la différenciation et la fusion des progéniteurs ostéoclastiques, et d'activer les ostéoclastes matures [Purroy and Spurr, 2002]. Le $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ favorise également la sécrétion de VEGF par les ostéoblastes qui pourra

agir sur l'activité des cellules endothéliales et réguler la fonction ostéoblastique [Wang et al., 1997].

La calcitonine, hormone polypeptidique, est un puissant inhibiteur de la résorption osseuse ostéoclastique, mais ses effets sont transitoires (48 à 72 h). Ses effets sur les ostéoclastes sont dépendants de la reconnaissance d'un récepteur couplé à l'adénylate cyclase qui entraîne la production AMPc. La calcitonine provoque en particulier la rétraction des ostéoclastes et leur désagrégation en cellules mononuclées [Del Fattore et al., 2008]. Elle inhibe également la formation ostéoclastique par inhibition de la prolifération de ses progéniteurs et de la différenciation des cellules engagées dans la maturation ostéoclastique.

D'autres facteurs systémiques peuvent également contrôler le remodelage osseux. C'est le cas des glucocorticoïdes qui favorisent la résorption osseuse en inhibant directement les ostéoblastes ou en agissant de manière indirecte en inhibant la capacité des ostéoclastes à stimuler l'activité des ostéoblastes [Del Fattore et al., 2008].

Le déficit en œstrogènes chez les femmes ménopausées et en androgènes chez les hommes âgés peuvent être à l'origine d'une ostéoporose. Les œstrogènes et androgènes sont connus pour atténuer le taux d'ostéoclastes, favoriser la survie des ostéoblastes et participer ainsi à une augmentation de la formation osseuse [Del Fattore et al., 2008].

Enfin, les rétinoïdes stimulent directement les ostéoclastes. L'excès de vitamine A peut en particulier conduire à une augmentation de la résorption osseuse [Del Fattore et al., 2008].

• *Les facteurs mécaniques*

D'autres facteurs tels que les facteurs mécaniques régulent ce remaniement osseux. En effet, l'exercice physique engendre des contraintes mécaniques qui s'exercent sur les cellules osseuses et celles-ci vont répondre en sécrétant différents facteurs tels que la PGE₂ ou le NO, stimulateurs de la formation osseuse [Klein-Nulend et al., 2003]. Au contraire, l'immobilisation (l'absence de contraintes mécaniques) peut entraîner une perte osseuse.

Le rôle des facteurs mécaniques dans les mécanismes de réparation osseuse sera plus particulièrement développé dans la troisième partie de cette revue bibliographique.

En résumé, les processus qui déterminent la structure et la fonction du tissu osseux sont soumis à plusieurs modes de régulation (biochimiques, mécaniques...). La succession de ces événements liés dans le temps et l'espace, conduit à la formation d'une structure devant être fonctionnelle tant sur le plan mécanique que métabolique et ce pendant toute la vie de l'individu. Tout déséquilibre dans ces événements peut conduire à de nombreuses physiopathologies osseuses principalement liées à une perte de la fonction des cellules osseuses, à savoir les ostéoblastes et les ostéoclastes et de leur couplage cellulaire.

Cependant, compte tenu de la structure de ce tissu conjonctif minéralisé, innervé et vascularisé, la formation de ce tissu et son remodelage ne peuvent être sous le seul contrôle des cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques. L'activité des tissus environnants tels que

les vaisseaux sanguins participent activement à l'élaboration et au remodelage du tissu osseux, et parmi les différentes activités cellulaires, la communication entre les cellules endothéliales et les cellules osseuses joue un rôle majeur. Une connaissance approfondie des facteurs qui influencent la vascularisation du tissu osseux pourra, à plus ou moins long terme, expliquer certaines physiopathologies osseuses et fournir d'importantes données pour le développement de nouvelles techniques de régénération osseuse.

II. La relation entre le tissu osseux et les vaisseaux sanguins

Le tissu osseux est un tissu conjonctif minéralisé et vascularisé contrairement aux autres tissus conjonctifs comme le cartilage. D'un point de vue physiologique, la vascularisation joue un rôle essentiel lors des mécanismes de réparation, de développement et de remodelage du tissu osseux, rôle souligné par l'antériorité de la néo-vascularisation aux sites d'ostéogenèse.

A. La vascularisation dans le tissu osseux

1) La formation de vaisseaux sanguins

On distingue deux types de formation de vaisseaux sanguins : la vasculogenèse et l'angiogenèse.

La vasculogenèse est la formation de vaisseaux sanguins *de novo* à partir de cellules progénitrices (hémangioblastes) qui vont se différencier en cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et fibroblastes pour constituer les trois feuillets des vaisseaux sanguins : l'intima, la media et l'adventice. Cette formation se déroule lors du développement embryonnaire et très rarement chez l'adulte (Figure 13 A).

Au contraire, l'angiogenèse se définit par une formation de vaisseaux sanguins chez l'adulte, à partir du bourgeonnement de vaisseaux préexistants. Suite à des signaux spécifiques, les cellules endothéliales de vaisseaux sanguins existants migrent et forment une nouvelle structure tubulaire qui crée un nouveau vaisseau sanguin (Figure 13 B).

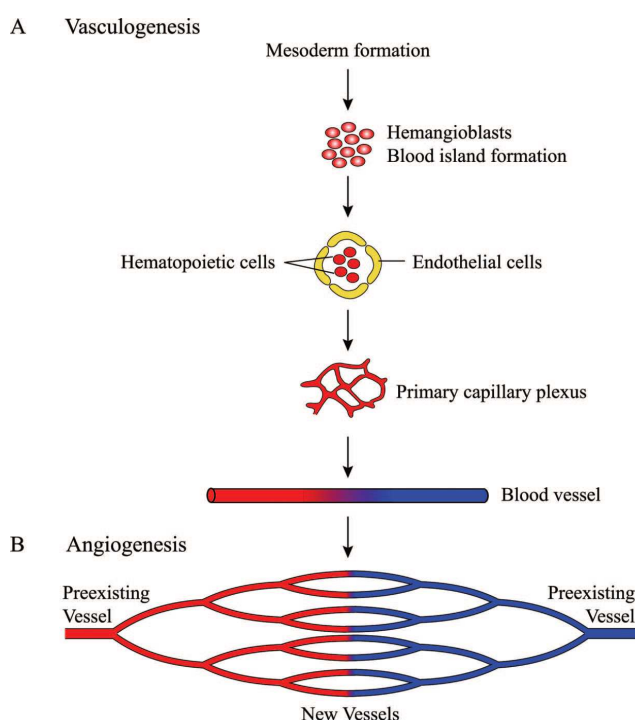


Figure 13. Mécanismes de la vasculogenèse (A) et de l'angiogenèse (B) [Lamalice et al., 2007].

Les vaisseaux sanguins qui constituent l'organisme sont de différents diamètres, taille et composition. La Figure 14 montre la composition cellulaire des différents types de vaisseaux sanguins. La formation d'un tube de cellules endothéliales est la première étape dans l'élaboration d'un vaisseau sanguin et constitue un sinusöide (Figure 14 a). Les capillaires, composés d'un tube de cellules endothéliales entourées de péricytes et d'une membrane basale, sont les vaisseaux majoritaires présents dans les tissus du corps humain dont le tissu osseux (Figure 14 b). Grâce à leur rapport surface/volume important, ils sont le lieu principal d'échanges en nutriments entre le sang et le tissu. Les vaisseaux plus larges (veinules et artérioles) sont constitués de cellules endothéliales recouvertes par des cellules musculaires lisses imprégnées dans une matrice extracellulaire (Figure 14 c). Puis les vaisseaux larges et les artères sont composés des trois feuillets précédemment énumérés : l'intima, la media et l'adventice (Figure 14 d).

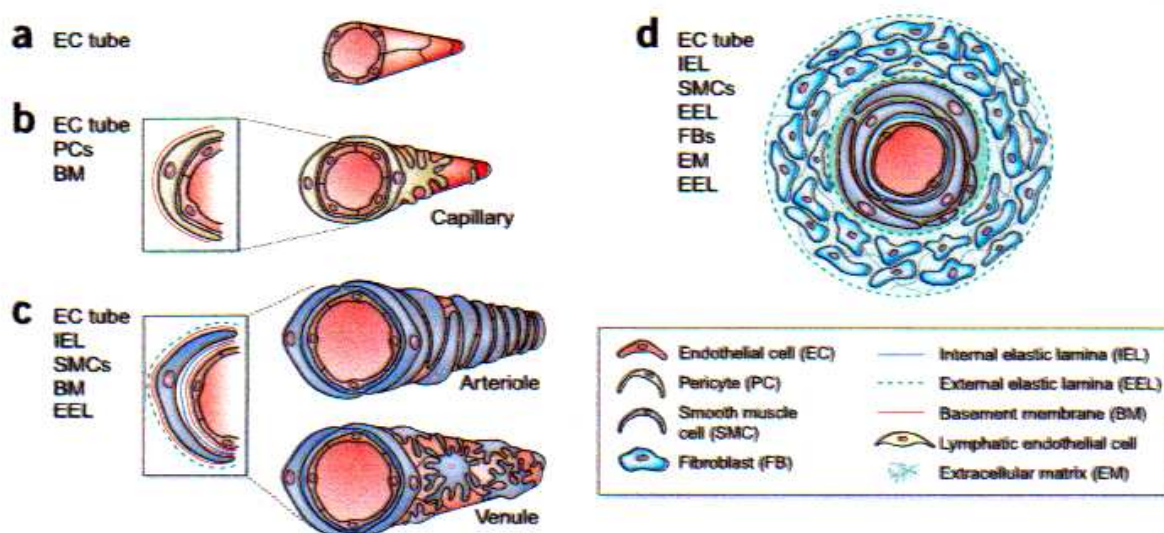


Figure 14. Structure et formation des vaisseaux sanguins [Jain, 2003].

2) La vascularisation du tissu osseux

La vascularisation du tissu osseux est essentielle puisqu'elle participe à la formation et au maintien de structure tissulaire présentant des architectures très différentes : les systèmes corticaux, spongieux et médullaires. La vascularisation joue également un rôle fondamental dans les fonctions du tissu osseux : rôle mécanique, rôle hématologique et hémodynamique, rôle métabolique dans l'équilibre phosphocalcique et rôle dans la mobilisation de cellules souches.

Dès 1953, avec les travaux de Trueta et Harrison [Trueta and Harrison, 1953], la vascularisation osseuse a pu être mise en évidence dans la tête fémorale grâce à la technique de microangiographie au sulfate de baryum. Un peu plus tard, Fisher et al. [Fischer et al., 1977] ont repris cette technique et leurs travaux ont permis la visualisation des vaisseaux sanguins dans l'humérus (Figure 15 A).

Comme dans tout organe, le système vasculaire de l'os se décompose en trois parties : le système artériel, capillaire et veineux.

L'alimentation des os longs est assurée par des artères richement anastomosées qui se ramifient en artérioles puis en capillaires transcorticales (Figure 15 B). Les artères diaphysaires nourricières sont responsables de l'irrigation de la région médullaire ainsi qu'une partie des épiphyses. Ces artères se ramifient et donnent naissance au réseau endostéal mais rejoignent aussi les capillaires épiphysaires et métaphysaires. Puis, les artères situées au niveau des épiphyses et métaphyses forment un réseau anastomotique dans l'ensemble de l'os trabéculaire. Les artères sont aussi présentes au niveau du périoste à la surface de la diaphyse.

La microcirculation de l'os est assurée par les nombreux capillaires et sinusoides présents au niveau médullaire, cortical et périosté. Les vaisseaux du système cortical circulent dans les canaux de Havers, au centre de l'ostéon mais aussi par les canaux de Volkman.

Enfin, les veines du système vasculaire osseux sont très nombreuses puisqu'elles doublent, voire plus, le système artériel (Figure 15 C). Le retour veineux médullaire se fait grâce à un volumineux sinus veineux central parallèle aux artères nourricières. Les veines nourricières et perforantes assurent le drainage sanguin des régions épiphysaires et métaphysaires vers l'extérieur de l'os. Enfin, les veines périostées forment un réseau plus riche et plus irrégulier que les artères périostées.

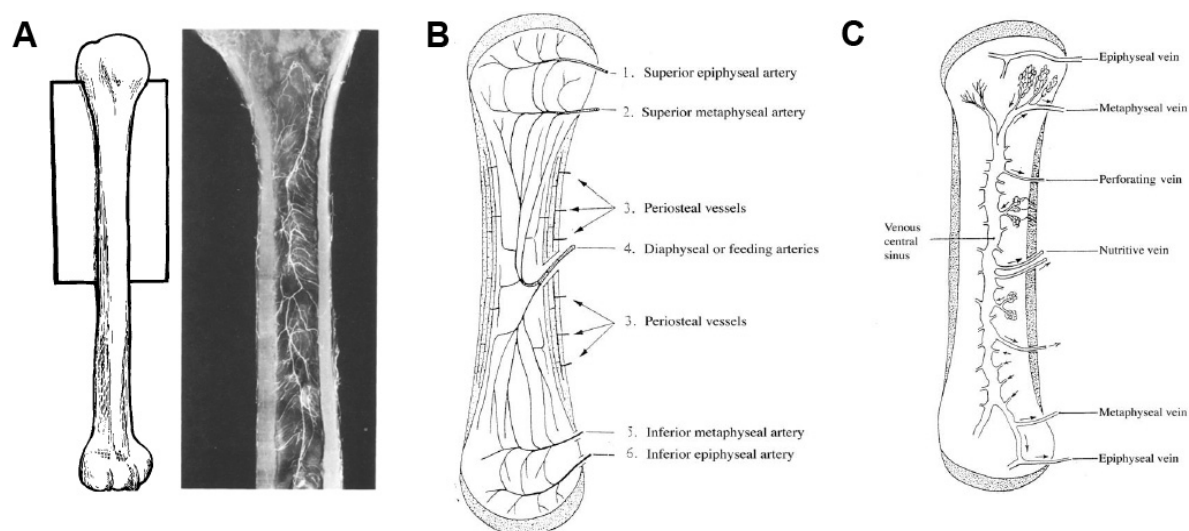


Figure 15. La Vascularisation Osseuse.

A : Visualisation de la vascularisation d'un os long grâce à la technique de microangiographie au sulfate de baryum. Coupe frontale de la moitié supérieure de l'humérus chez un adulte [Fischer et al., 1977]. Le système nourricier centro-médullaire et les vaisseaux périostés sont bien visibles.
B et C : Schéma des systèmes artériel et veineux d'un os long, respectivement [Laroche, 2002].

Les liens étroits entre le remodelage osseux et la vascularisation ont été mis en évidence par la présence de capillaires artériels dans les lacunes de résorption et l'existence de sinus veineux associés à la néo-formation osseuse [Choi et al., 2002; Laroche, 2002]. Ainsi, la vascularisation intra-osseuse peut et doit s'adapter au remodelage osseux par production de

néo-vaisseaux, grâce à l'angiogenèse ou par augmentation du débit sanguin par vasodilatation. De manière générale, toute circonstance qui provoque une augmentation du remodelage osseux s'accompagne d'une augmentation du nombre de vaisseaux et du débit sanguin.

La vascularisation du tissu osseux est indispensable à sa croissance, sa minéralisation et sa réparation. Il a été montré qu'une vascularisation absente ou défectueuse aboutit à un développement anormal du tissu osseux (Maes et al., 2002), à une réparation incomplète [Glowacki, 1998], et peut engendrer des pathologies osseuses [Alagiakrishnan et al., 2003; Childs, 2005; Lazzarini et al., 2004]. Ceci suppose qu'une communication étroite existe entre les cellules osseuses et les cellules endothéliales vasculaires.

Ces deux types cellulaires peuvent communiquer de différentes manières [Lecanda et al., 1998]. Les ostéoblastes peuvent stimuler la formation de nouveaux vaisseaux et réciproquement, les cellules endothéliales peuvent agir sur le remodelage osseux soit en agissant sur la fonction ostéoblastique ou de façon moins connue sur la fonction ostéoclastique. Les cellules ostéoblastiques et endothéliales peuvent aussi réguler la différenciation des cellules souches qui sont présentes au sein de la moelle osseuse respectivement au niveau des niches ostéoblastique et vasculaire. En agissant de manière paracrine, les acteurs privilégiés de cette communication sont les facteurs angiogènes tels que le VEGF qui reste l'élément clé de ce couplage cellulaire mais aussi des facteurs ostéogènes comme les BMPs (BMP2, BMP4, BMP7) (Figure 16). Par ailleurs, les cellules peuvent aussi communiquer en créant des jonctions communicantes grâce notamment à l'activité des connexines, comme cela a pu être identifié au laboratoire [Villars et al., 2002].

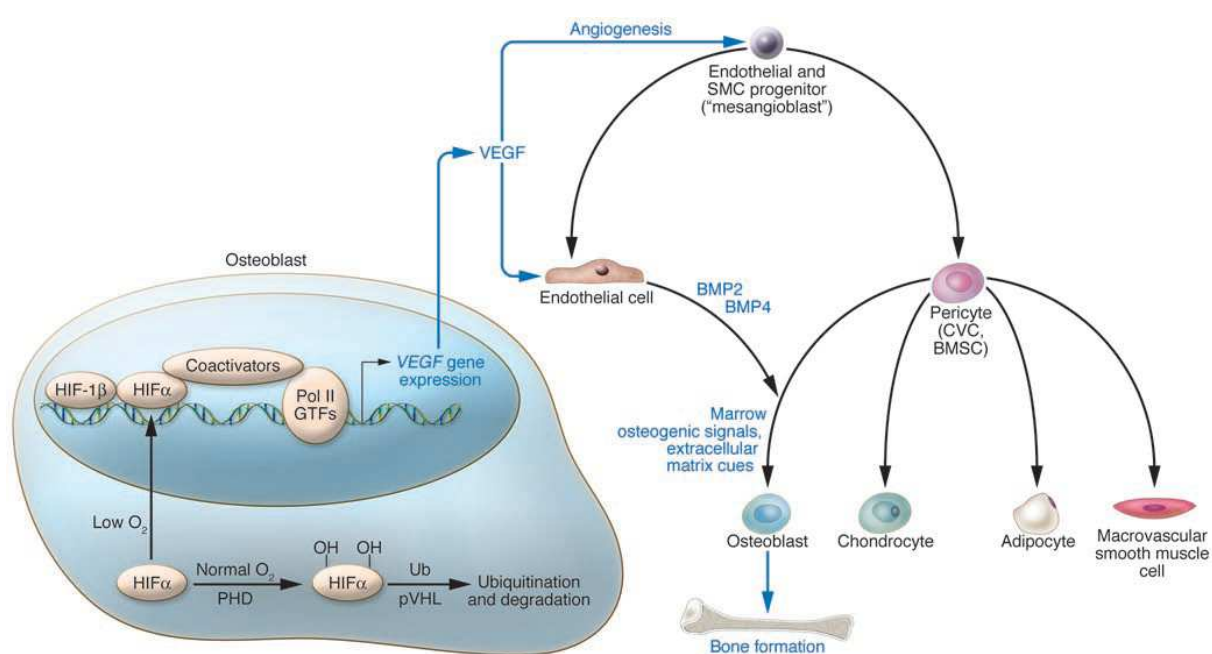


Figure 16. Rôle central du VEGF et des BMPs lors de la communication entre cellules endothéliales et ostéoblastiques [Lecanda et al., 1998].

B. La communication ostéo-endothéliale

Au sein de la moelle osseuse, cette relation entre cellules ostéoblastiques et endothéliales repose sur l'existence de niches de cellules souches, appelées niches ostéoblastique et vasculaire.

1) Les niches ostéoblastique et vasculaire dans la moelle osseuse

Une niche de cellules souches est un microenvironnement spécifique situé dans un tissu adulte, où résident des cellules souches qui prolifèrent et se différencient en un grand nombre de progéniteurs selon les signaux envoyés par les cellules de support délimitant ce microenvironnement.

Comme cela a été précisé dans le paragraphe I.C.1., la moelle osseuse est composée de deux groupes de cellules souches :

- les cellules souches hématopoïétiques (Hematopoietic stem cells, HSCs) à l'origine des cellules sanguines, immunitaires dont la lignée monocyttaire à l'origine des ostéoclastes (Figure 3) [Yin and Li, 2006]
- les cellules souches mésenchymateuses (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) qui comprennent toutes les cellules souches non-hématopoïétiques et donnent naissance aux chondrocytes, ostéoblastes, fibroblastes, adipocytes, cellules endothéliales et myocytes (Figure 3) [Ahdjoudj et al., 2004; Beresford, 1989; Short et al., 2003].

Les lignées de ces cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses coexistent dans la moelle osseuse mais ne possèdent pas chez l'adulte de précurseur commun. Deux niches ont été mises en évidence :

- la niche ostéoblastique où les cellules souches sont en contact et influencées par les ostéoblastes de l'endoste (Figure 17),
- la niche vasculaire où les cellules progénitrices peuvent être modulées par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins avoisinants (Figure 17).

a) La niche ostéoblastique

Plusieurs études ont montré que les HSCs et les MSCs peuvent être présentes au niveau de l'endoste dont la surface est recouverte d'ostéoblastes et cette étroite collaboration entre cellules souches et ostéoblastes constitue la niche ostéoblastique (Figure 17) [Beresford, 1989]. Ce arrangement anatomique suggère qu'il existe une communication entre les cellules souches et les ostéoblastes et que ces dernières régulent à la fois l'activité des HSCs et des MSCs. Grâce à un modèle de souris transgéniques déficientes en cellules ostéoblastiques, Visnjic et al. ont montré que la présence et la différenciation des HSCs en cellules sanguines sont dépendantes des ostéoblastes [Visnjic et al., 2004]. Il a été également montré que les ostéoblastes sont capables de sécréter RANKL, le ligand du récepteur RANK capable d'activer NF- κ B, qui va stimuler la différenciation des ostéoclastes

[Quinn et al., 2001]. Tout en se différenciant, les cellules souches migrent vers les vaisseaux sanguins au centre de la moelle osseuse afin de devenir circulantes au sein du sang périphérique, ce phénomène est appelé « mobilisation » ou « recrutement » (Figure 17) [Heissig et al., 2002].

b) La niche vasculaire

Les cellules souches peuvent aussi être en contact avec les vaisseaux sinusoïdaux de la moelle et communiquer alors avec les cellules endothéliales de ces vaisseaux qui créent la niche vasculaire (Figure 17). Plusieurs études ont montré que les cellules endothéliales pourraient être responsables du recrutement des cellules souches. En effet, la migration des cellules souches lors de leur mobilisation pourrait être orchestrée par les cellules endothéliales vasculaires [Avecilla et al., 2004; Kopp et al., 2005]. Cette influence peut être notamment expliquée par le fait que l'endothélium sinusoïdal fournit un microenvironnement riche en nutriments, avec une forte concentration en oxygène et en facteurs de croissance. La niche vasculaire peut aussi avoir un rôle d'assistance des cellules souches lors de leur migration trans-endothéliale tant lors de leur mobilisation (et de leur passage vers la circulation périphérique) que lors de leur « retour » vers la moelle osseuse, lors du processus de « homing » [Lapidot et al., 2005]. En effet, les cellules souches peuvent quitter la circulation sanguine et revenir vers la moelle osseuse (Figure 17).

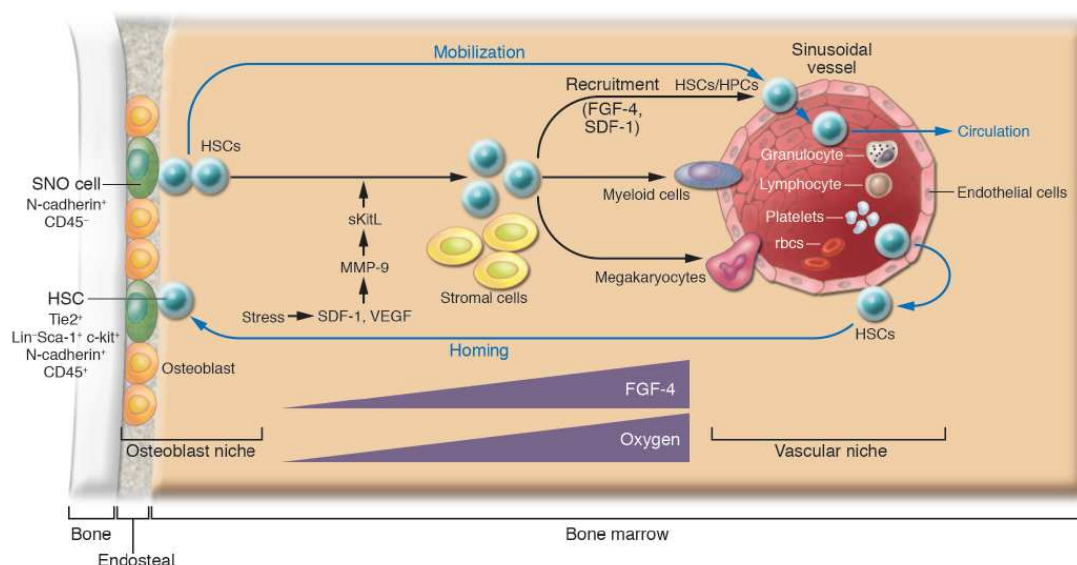


Figure 17. Les niches ostéoblastique et vasculaire de cellules souches dans la moelle osseuse soumises aux mécanismes de « mobilisation » et de « homing » [Yin and Li, 2006].

L'existence de ces deux niches met en évidence l'importance de la communication cellulaire, en particulier entre les cellules ostéogéniques et les cellules endothéliales. Ces dernières composent les capillaires sanguins de la moelle osseuse et peuvent avoir une influence non négligeable sur la différenciation des ostéoprogéniteurs. De la même manière, les cellules osseuses peuvent influencer sur l'activité des cellules endothéliales et ces différents modes de communication seront détaillés dans le paragraphe suivant.

2) Les modes de communication cellulaire

Le fonctionnement normal de tout organisme multicellulaire dépend de la coordination des cellules qui le composent. Cette coordination implique un système de communication grâce auquel chaque cellule est informée de l'activité des cellules voisines et règle en conséquence son propre niveau de fonctionnement. Les ostéoblastes peuvent être en contact avec plusieurs types cellulaires : les ostéocytes, les cellules bordantes, des cellules souches de moelle osseuse. Mais, ils peuvent aussi être en contact avec les cellules endothéliales des vaisseaux permettant en particulier l'apport en nutriments du tissu osseux.

Les cellules responsables de la vascularisation et les cellules osseuses peuvent communiquer *via* la production de facteurs solubles comme le VEGF, le TGF- β , les BMPs ou encore les prostaglandines, qui peuvent agir de façon autocrine et/ou paracrine. Outre les facteurs sécrétés, d'autres modes de communication peuvent exister en sollicitant en particulier des jonctions cellulaires. Les cellules peuvent créer des jonctions intercellulaires qui peuvent être communicantes *via* la fonction des connexines, adhérentes *via* l'existence des cadhérines ou en créant des interactions avec la matrice extracellulaire, *via* l'activité des intégrines (Figure 18).

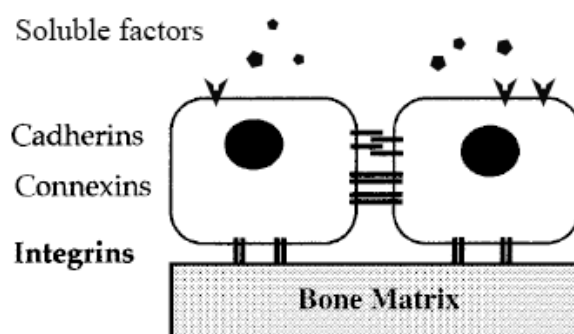


Figure 18. Les modes de communication entre les cellules. D'après Marie, 2002.

a) Les jonctions cellulaires

• Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes ont un rôle primordial dans la communication cellulaire en permettant aux cellules d'être physiquement reliées entre elles. Elles permettent le contrôle de fonctions cellulaires essentielles comme la migration, la prolifération, la différenciation ou l'apoptose [Cheng et al., 1998; Wang et al., 2007a]. Les jonctions adhérentes sont contrôlées par la famille des molécules d'adhésion cellulaires (CAM) dont les cadhérines (Cadh) font parties. Selon leur structure, les cadhérines sont classées en 5 groupes : les cadhérines de type I, les cadhérines de type II, les cadhérines desmosales, les protocadhérines et les autres cadhérines [Potter et al., 1999]. Les cadhérines de type I possèdent un motif peptidique HAV (His-Ala-Val) sur l'extrémité N-terminale leur permettant l'adhésion avec d'autre cadhérines (Figure 19).

Les cadhérines ont un poids moléculaire d'environ 120 kDa et sont formées d'un long domaine extracellulaire N-terminal, d'une chaîne transmembranaire et d'un domaine intracellulaire C-terminal. L'homodimérisation des cadhérines, dépendante du Ca^{2+} , se fait par la reconnaissance des 5 domaines extracellulaires identiques et la formation d'une structure en « zipper » (fermeture éclair) permet sa stabilisation (Figure 19). La queue cytoplasmique est aussi très importante pour la stabilisation des jonctions adhérentes grâce à ses liaisons aux protéines du cytosquelette. En effet, les cadhérines sont liées aux fibres d'actine *via* les protéines intermédiaires α et β -caténine, la plakoglobuline, la vinculine ou le ZO-1 (Zona Occludens-1). Cette structure fournit aux cellules une forte adhésion entre elles qui est nécessaire pour leur communication. Mais cette structure n'est pas figée et peut se désolidariser sous l'effet de divers stimuli.

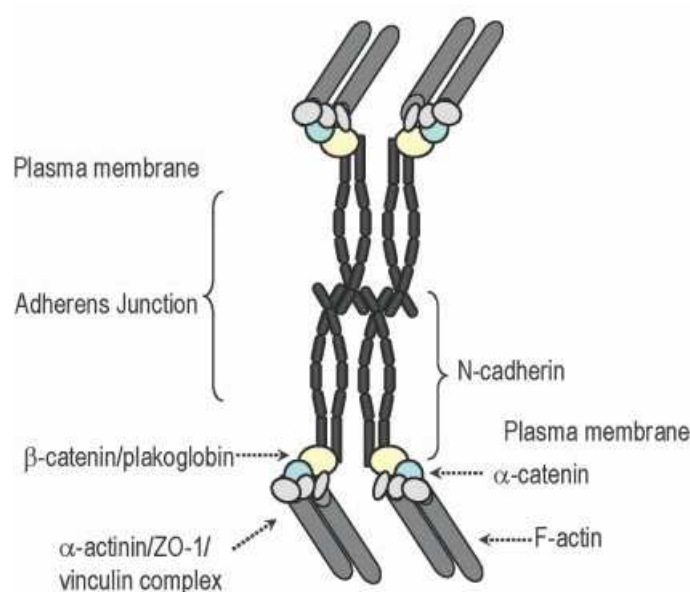


Figure 19. Jonctions adhérentes formées par la liaison de 2 cadhérines [Stains and Civitelli, 2005].

Les ostéoblastes expriment plusieurs types de cadhérines : la N-Cadhérine (Neurale) [Marie, 2002], la Cadhérine 11 / OB-Cadhérine (Ostéoblastique) [Okazaki et al., 1994], la E-Cadhérine (Epithéliale) [Hay et al., 2000] et la Cadhérine 4 / R-Cadhérine (Rétinale) [Lecanda et al., 2000]. Les cellules endothéliales, quant à elles, expriment la N-Cadhérine et la VE-Cadhérine (Vascular Endothelial-Cadhérine ou cadhérine 5) qui est spécifique au phénotype endothélial [Navarro et al., 1998].

Lorsque des liaisons sollicitant les cadhérines se créent entre deux ostéoblastes, les protéines α et β -caténine sont recrutées à la membrane, les fibres d'actine se réorganisent et les jonctions cellule-cellule se stabilisent (Figure 20A). En revanche, lorsque les facteurs stimulant la différenciation ostéoblastique entrent en jeu, la voie Wnt est activée et la β -caténine est alors transloquée au noyau pour stimuler la transcription de gènes spécifiques [Mbalaviele et al., 2006].

La VE-Cadhérine, présente à la membrane des cellules endothéliales, joue un rôle central dans le contrôle de la perméabilité de l'endothélium (Figure 20) [Lampugnani et al., 2006].

En effet, en absence de VEGF, les cellules sont quiescentes et forment des jonctions cellulaires *via* l'activité de la VE-Cadhérine qui est maintenue à la membrane dans un état non-phosphorylé (Figure 20B) [Wallez et al., 2006]. En présence de VEGF, le récepteur VEGFR-2 se lie à Src qui va phosphoryler la VE-Cadh. Les jonctions adhérentes se dissocient et deux voies de signalisation différentes peuvent être activées : en absence de signal angiogène, la survie cellulaire est stimulée par la voie PI3K/AKT ; alors que les cellules ayant reçu un signal pro-angiogène, entrent en prolifération après stimulation par la voie des MAPKs et la migration cellulaire est activée par Cdc42. La protéine β -caténine pourrait aussi être transloquée au noyau pour activer des gènes impliqués dans le cycle cellulaire comme la cycline D1.

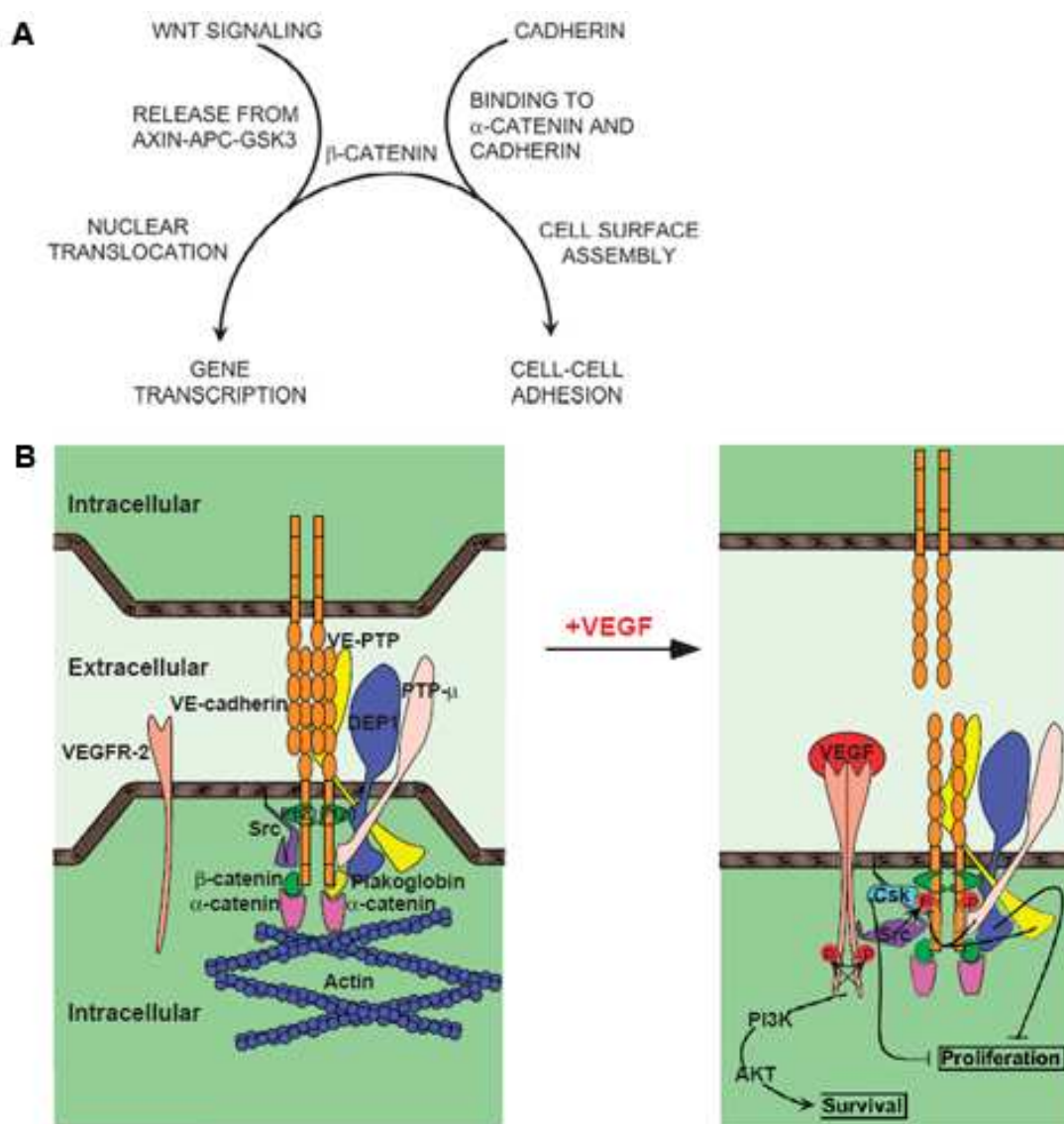


Figure 20. Voies de signalisation sollicitées par les cadhérines dans les cellules ostéogéniques (A) [Mbalaviele et al., 2006] et endothéliales (B) [Wallez et al., 2006].

- *Les jonctions communicantes ou jonctions « gap »*

Les jonctions communicantes participent de façon cruciale à la communication intercellulaire et sont présentes dans tous les types cellulaires, excepté dans les érythrocytes, les plaquettes et les spermatozoïdes [Evans and Martin, 2002]. Au niveau du tissu osseux, le processus de remodelage suggère une synchronisation fine entre les activités des cellules ostéogéniques et leurs cellules voisines et les jonctions communicantes permettent de réguler cette communication. Les jonctions communicantes ou plaques jonctionnelles sont des domaines spécialisés de la membrane cytoplasmique localisés dans les zones de contacts intercellulaires. Les ostéoblastes peuvent communiquer entre eux et avec leur cellules voisines, comme les ostéocytes grâce à ces jonctions communicantes, aussi appelées jonctions « gap » (Figure 21).

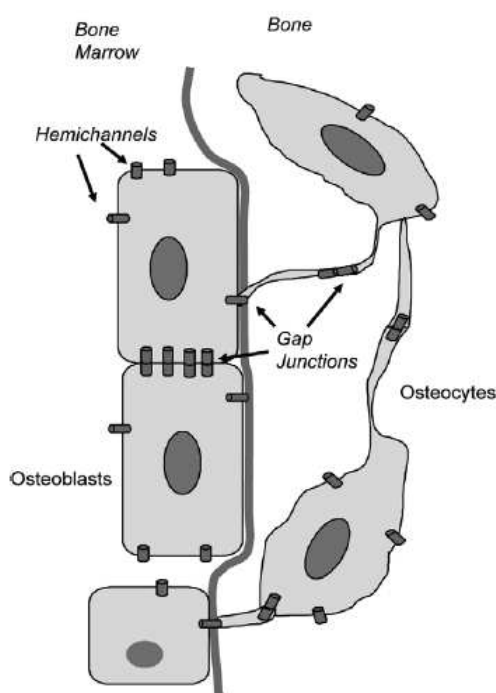


Figure 21. Jonctions communicantes entre cellules ostéogéniques [Civitelli, 2008].

Les jonctions « gap » sont composées d'une multitude de canaux aqueux qui établissent une continuité cytoplasmique entre deux cellules adjacentes. Chaque canal résulte de l'assemblage de deux héli-canaux ou connexons, chacun enchâssé dans la membrane plasmique des cellules en apposition. Un connexon est constitué de six monomères de Connexine (Cx) disposés côte à côte pour former un cylindre transmembranaire (Figure 22).

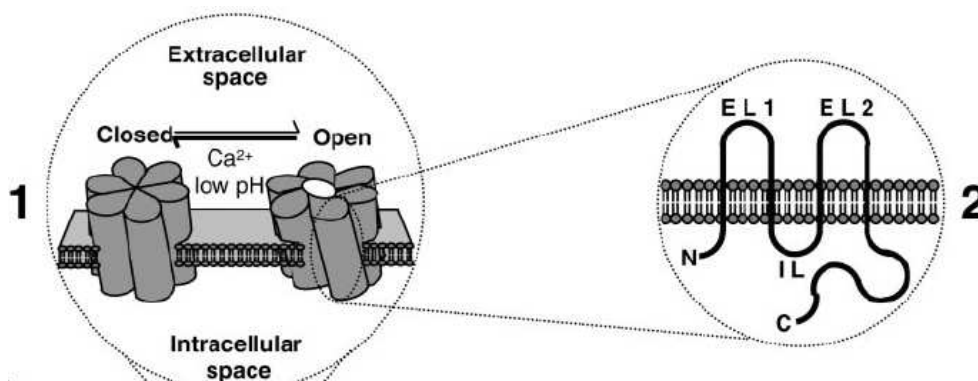


Figure 22. Connexons et Connexines (Saez, 2003).

Les molécules de connexines (2) s'oligomérisent en une structure hexamérique, le connexon (1). Les connexons de cellules adjacentes interagissent pour former des canaux aqueux intercellulaires. Ces canaux se concentrent dans une région spécialisée de la membrane cytoplasmique : les jonctions communicantes. EL : boucle extracellulaire ; IL : boucle intracellulaire ; N : extrémité N-terminale ; C : extrémité C-terminale.

La connexine qui constitue le châssis des connexons, est codée par une vingtaine de gènes connus à ce jour. Chaque isoforme est composée de quatre domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires (EL1 et EL2), une intracellulaire (IL) et deux extrémités N et C-terminales intracytoplasmiques (N et C) (Figure 22) [Saez et al., 2003]. Les boucles extracellulaires, impliquées dans l'assemblage des paires de connexons sont extrêmement conservés, de même que l'extrémité N-terminale. En revanche, la séquence de l'extrémité C-terminale et celle de la boucle IL sont hautement variables. Les connexines sont des phosphoprotéines dont le profil électrophorétique peut montrer au moins quatre bandes nommées selon la nomenclature classique : NP/P0, P1, P2 et P3 correspondant à différents états de phosphorylation de la protéine. Le type de phosphorylation détermine la fonction de chaque connexine. Par exemple, La forme P2 de la connexine 43 est associée à une localisation membranaire au sein des jonctions communicantes [Lampe and Lau, 2000].

De nombreux types cellulaires sont capables d'exprimer plusieurs isoformes de connexines, ce qui conduit à l'assemblage potentiel de connexons homomériques comme hétéromériques. Les principales formes de connexines décrites dans le tissu osseux et plus particulièrement dans les cellules ostéoblastiques sont la Cx43 (de poids moléculaire de 43 kDa), la Cx45 et la Cx46. Les cellules endothéliales expriment quant à elles, les isoformes Cx43, Cx40 et Cx37. Chaque isoforme se caractérise par des propriétés particulières de perméabilité variable à chaque connexon selon sa composition en isoformes de connexine. Dans ces conditions, la fonction du connexon et des connexines qui le composent est différente. Dans les ostéoblastes en particulier, la Cx43 stimulerait la différenciation ostéoblastique tandis que la Cx45 jouerait plutôt un rôle inhibiteur de cette différenciation [Schiller et al., 2001]. Villars et al. ont montré que les cellules endothéliales étaient susceptibles de participer à la régulation de l'ostéogenèse par l'établissement de jonctions communicantes, principalement constituées de Cx43, entre les ostéoblastes et les cellules endothéliales humaines [Villars et al., 2002]. Dans ce modèle, le couplage métabolique entre les cellules endothéliales et les ostéoprogéniteurs humains régule la différenciation ostéoblastique [Guillot et al., 2008; Villars et al., 2002].

De plus, les jonctions communicantes composées de Cx43 participent vraisemblablement à la réponse biologique des cellules osseuses exposées à un stimulus mécanique en permettant le passage de seconds messagers d'une cellule à l'autre *via* ces connexons [Rubin et al., 2006].

En effet, les jonctions « gap » sont perméables aux molécules inférieures à 1kDa. Physiologiquement, les ions et les seconds messagers comme l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique), le GMPc (guanylate monophosphate cyclique), l'IP3 (inositol trisphosphate) et le Ca^{2+} sont d'excellents candidats pour diffuser à travers les canaux de connexines. Les jonctions « gap » permettent alors la propagation des signaux activés par la liaison de ligands à leur récepteur comme la PTH. Lors d'une stimulation mécanique, les seconds messagers peuvent activer la voie des MAPK *via* la phosphorylation de ERK qui induira la phosphorylation des facteurs de transcription Sp1 et Sp3. Ces facteurs peuvent se fixer alors sur la séquence CxRE (connexin Response Element) des gènes codant par exemple pour le collagène de type 1 ou l'ostéocalcine. [Civitelli, 2008].

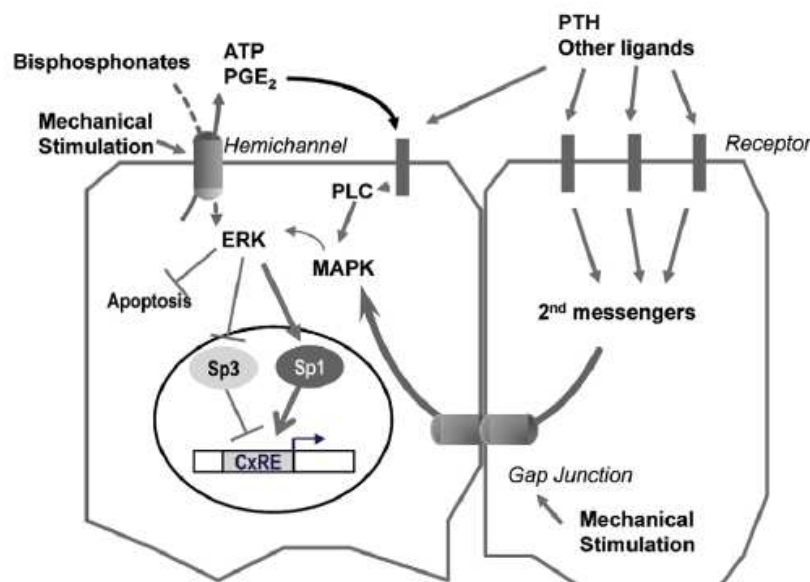


Figure 23. Voie de signalisation et jonctions gap [Civitelli, 2008].

b) Les interactions cellules – matrice extracellulaire

Les cellules peuvent établir des jonctions entre différents types cellulaires mais elles sont aussi capables d'interagir avec leur matrice extracellulaire. En effet, les cellules synthétisent et sécrètent des protéines matricielles qui sont, pour certaines, reconnues par des récepteurs présents à la membrane cellulaire, appelés intégrines.

Les intégrines sont des récepteurs cellulaires d'adhésion, capables de relier la matrice extracellulaire au cytosquelette, d'intégrer des signaux extracellulaires jusqu'au noyau cellulaire, mais aussi capables de transmettre des signaux internes vers l'environnement cellulaire. Ce sont des hétérodimères formés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β (Figure 24), reliées par une liaison non-covalente et qui contiennent dans leur domaine extracellulaire des sites de liaisons spécifiques à une séquence peptidique précise.

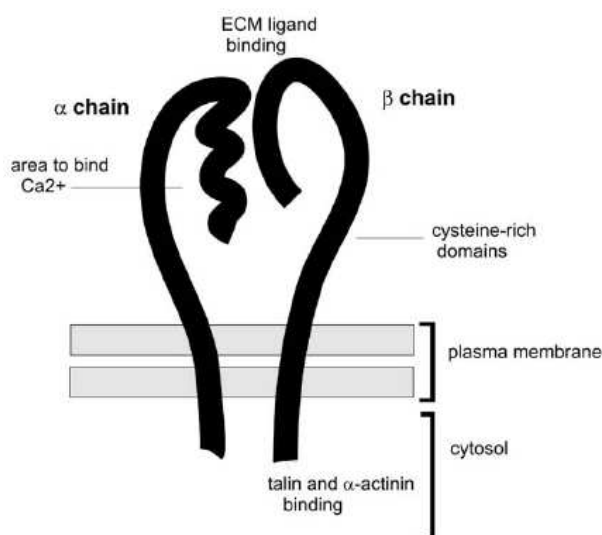


Figure 24. Les sous-unités α et β d'intégrines [Siebers et al., 2005].

Parmi ces séquences, le motif peptidique RGD (Arg-Gly-Asp) a été identifié depuis 1984 comme étant la séquence minimale favorisant l'adhésion cellulaire [Pierschbacher and Ruoslahti, 1984]. Elle est présente dans la séquence protéique de nombreuses protéines matricielles comme la vitronectine, la fibronectine, le collagène, la laminine ou encore l'ostéopontine. Actuellement, cette séquence est largement utilisée pour modifier la surface des biomatériaux afin de favoriser l'adhésion cellulaire et la formation de contacts focaux [Chollet et al., 2007; Guillou-Buffello et al., 2008; Hersel et al., 2003; Meury et al., 2006; Pallu et al., 2005]. Il existe aussi d'autres séquences peptidiques reconnues par les cellules et favorisant l'adhésion cellulaire comme la séquence YIGSR (Tyr-Iso-Gly-Ser-Arg) ou encore REDV (Arg-Glu-Asp-Val), plus spécifiques de l'adhésion des cellules endothéliales [Plouffe et al., 2007].

Les ostéoblastes peuvent exprimer les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$ et $\beta 5$ [Siebers et al., 2005]. Les ostéoclastes expriment les hétérodimères $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$, ce dernier pouvant être aussi exprimé par les cellules endothéliales. L'hétérodimère $\alpha v\beta 3$ a d'ailleurs été observé sur la membrane plasmique des podosomes ostéoclastiques au niveau des lacunes de Howship, lieu de la résorption osseuse [Del Fattore et al., 2008]. De plus, il a été montré que le VEGF peut stimuler la survie des ostéoclastes à conditions que la sous-unité $\beta 3$ soit exprimée [Yang et al., 2008].

Les intégrines sont aussi considérées comme des mécanorécepteurs car elles permettent de transmettre à la cellule des informations sur l'environnement mécanique auquel les cellules sont soumises [Rubin et al., 2006].

c) Contrôle paracrine de la communication ostéo-endothéliale

Différents types de facteurs peuvent intervenir dans le couplage entre les cellules endothéliales et les cellules ostéoblastiques. Ces facteurs peuvent être des facteurs de croissance ou d'autres molécules ayant la capacité de réguler le phénotype des cellules. Quelques uns de ces facteurs sont présentés dans le schéma proposé par Wang et al. (Figure 25) [Wang et al., 1997].

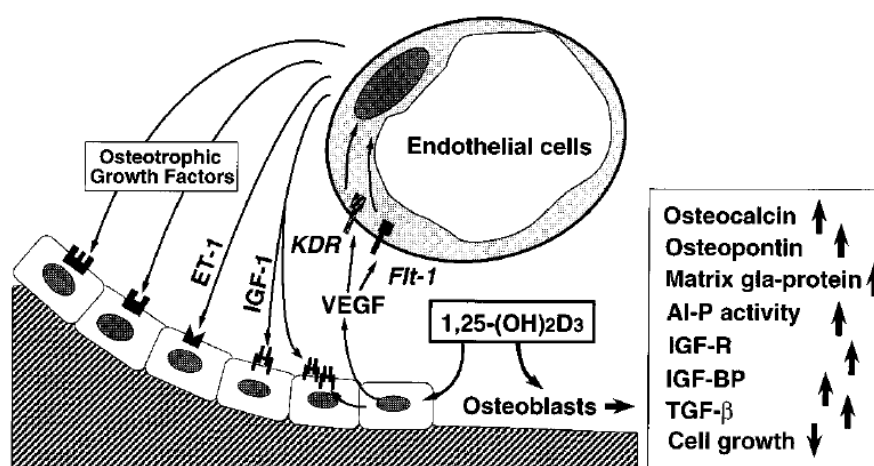


Figure 25. Les facteurs paracrine dans la communication ostéo-endothéliale [Wang et al., 1997].

Ces premiers travaux ont montré que le métabolite actif de la vitamine D (1,25 (OH)₂D₃) peut avoir un effet positif sur la réparation osseuse en favorisant la communication cellulaire entre les cellules endothéliales et les cellules ostéoblastiques par la sécrétion de facteurs de croissance dont le VEGF, facteur clé de ce couplage ostéo-endothélial [Wang et al., 1997].

- *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)*

Le VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor, est un promoteur majeur de la formation de nouveaux vaisseaux, tant physiologique que pathologique. Il appartient à une famille de protéines constituée de 6 membres: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et Placenta Growth Factor (PlGF) [Cross et al., 2003; Ferrara et al., 2003]. Le VEGF-A peut être exprimé en cinq isoformes différentes:

- le VEGF₁₄₅, VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆ qui ont le pouvoir de se fixer à la matrice extracellulaire par liaison à l'héparine,
- le VEGF₁₂₁ qui est soluble,
- et le VEGF₁₆₅ qui est la forme la plus abondante et qui peut être à la fois soluble et liée à la matrice [Neufeld et al., 1999] (Figure 26).

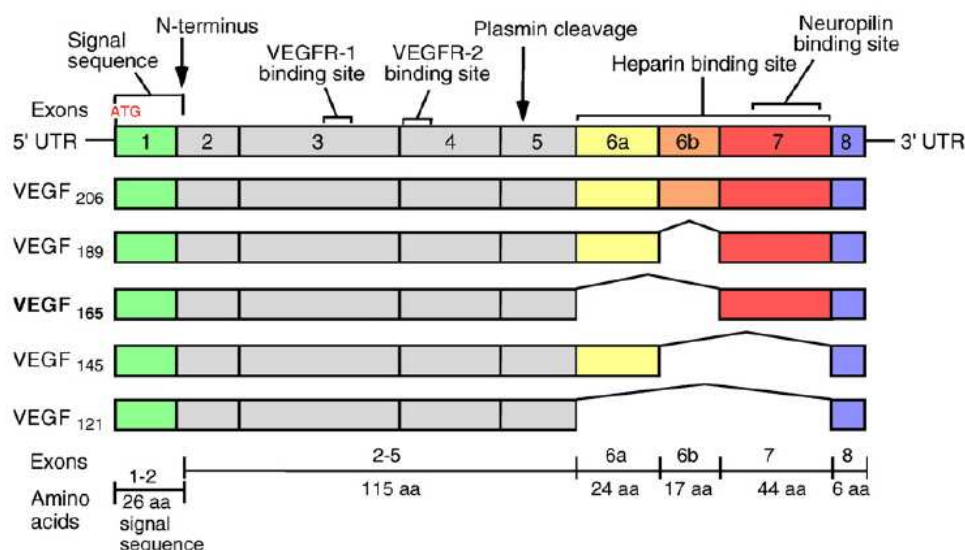


Figure 26. Les différents isoformes du VEGF-A.

L'épissage alternatif du gène codant pour le VEGF-A donne naissance à différents ARNm qui, eux-mêmes vont donner différentes formes du VEGF [Cross et al., 2003].

Les récepteurs au VEGF, VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) et VEGFR-3, sont des récepteurs à tyrosine kinase et se dimérisent après activation [Cross et al., 2003]. Chacun des récepteurs a une fonction propre.

Flt-1 peut être activé par le VEGF-A, le VEGF-B ou le PlGF et est impliqué dans le développement des HSCs ainsi que la migration des macrophages, monocytes. Il est exprimé par les HSCs, les macrophages et les monocytes mais aussi par les ostéoclastes. Ce récepteur existe également sous forme soluble. En se fixant au VEGF, il limite l'accessibilité de ce facteur aux récepteurs membranaires fonctionnels et va alors réguler négativement la vasculogénèse.

Le VEGFR-3 est principalement exprimé par les cellules endothéliales lymphatiques et impliqué dans le développement du système lymphatique. Les formes matures du VEGF-C et du VEGF-D peuvent se lier à ce récepteur.

Le KDR, exprimé par les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques mais aussi les mégacaryocytes et les HSCs, peut reconnaître le VEGF-A, le VEGF-C, le VEGF-D et le VEGF-E. Ce récepteur est considéré comme le médiateur majeur des différents effets physiologiques et pathologiques du VEGF-A. Ainsi, en se fixant au KDR, le VEGF-A active différentes voies de signalisation et régule les mécanismes de l'angiogénèse (Figure 27) [Olsson et al., 2006].

Après liaison du VEGF, le récepteur s'homodimérise et subit plusieurs phosphorylations situées sur des tyrosines (Figure 27). Ces phosphorylations entraînent l'activation de plusieurs voies de signalisation dont la voie ERK1/2 (Extracellular Regulated Kinase ou p42/p44 mitogen-activated protein kinase) qui va stimuler la prolifération des cellules endothéliales. Le KDR peut également activer PI3K (phosphoinositide 3-kinase) qui va entraîner la phosphorylation de Akt (ou PKB, Protéine Kinase B). Cette protéine va alors

inhiber l'apoptose des cellules endothéliales en agissant sur BAD (B-cell lymphoma 2 (Bcl2)-associated death promoter homologue) et la caspase 9. Akt peut également agir sur l'activité de la eNOS qui va synthétiser du NO et stimuler à la fois la perméabilité et la migration cellulaire. Les voies impliquant la MAPK p38 et la FAK (Focal Adhesion contact) peuvent également être activées et vont stimuler la migration des cellules endothéliales en agissant sur la réorganisation du cytosquelette d'actine et des contacts focaux [Cross et al., 2003; Olsson et al., 2006].

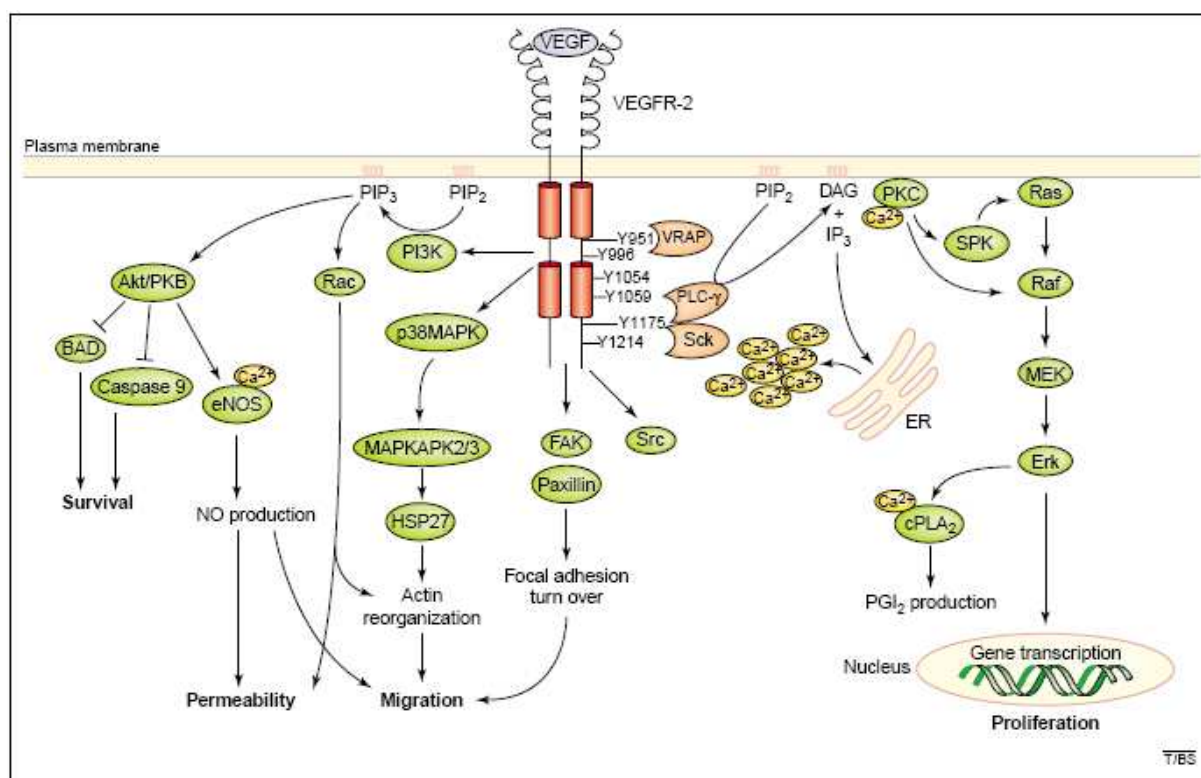


Figure 27. Voies de signalisation activées par le VEGF conduisant à différentes fonctions endothéliales: prolifération, survie, perméabilité ou migration [Cross et al., 2003].

Dans les os en développement, la présence de VEGF a été détectée avant la formation de vaisseaux sanguins, ce qui implique que ce facteur peut être sécrété par les cellules du système ostéo-articulaire [Zelzer et al., 2002]. Il a été montré que le VEGF peut être produit par les ostéoblastes qui vont ainsi réguler le phénotype des cellules voisines [Clarkin et al., 2007; Mayr-Wohlfart et al., 2002; Street et al., 2002]. Le VEGF joue un rôle majeur dans la réparation osseuse en étant libéré au niveau de l'hématome engendré par une fracture [Street et al., 2002].

Le VEGF peut aussi être impliqué dans la régulation des ostéoclastes en stimulant leur survie, leur différenciation et leur activité [Yang et al., 2008].

L'expression de VEGF peut être induite par de nombreux facteurs ayant une double fonction, angiogène et ostéogène comme les BMP2, BMP4 et BMP7, le bFGF, l'IGF-1, la PTH, le PDGF, ou encore le TGFβ. L'influence de ces facteurs peut être réciproquement régulée par la présence de VEGF [Carano and Filvaroff, 2003; Deckers et al., 2002].

L'hypoxie joue également un rôle important dans l'induction de la transcription du gène codant pour le VEGF. En effet, il est connu que l'hypoxie stimule la liaison de la protéine HIF (Hypoxia Inducible Factor) à une séquence spécifique présente sur de nombreux gènes dont le VEGF [Harris, 2002]. Il a été montré récemment que l'hypoxie stimulait l'expression du VEGF par des ostéoblastes murins et que les os longs de souris surexprimant le HIF1 α étaient plus denses et plus vascularisés que les souris contrôles [Wang et al., 2007b].

• Fibroblast Growth Factor (FGF)

Plusieurs sous types de FGFs ont été identifiés, mais les mieux caractérisés sont le aFGF (acid FGF ou FGF-1) et le bFGF (basic FGF ou FGF-2) et ont un poids moléculaire d'environ 17 kD. Ces deux isoformes de FGF sont ubiquitaires et connues pour stimuler la prolifération, la migration, la différenciation cellulaire et le développement du squelette [Carano and Filvaroff, 2003; Marie, 2008].

Le bFGF, en activant les voies de signalisation impliquant la Protéine Kinase C (PKC) ou les MAPK, stimule la différenciation des progéniteurs ostéoblastiques. L'expression des marqueurs ostéoblastiques tels que le Cbfa1/Runx2, la PAL, le collagène de type I ou encore l'ostéocalcine est augmentée (Figure 28). Le bFGF favoriserait également la dégradation de la matrice osseuse en augmentant l'expression de MMP (métallo-protéinase matricielle) et des activateurs du plasminogène (uPA, tPA). En culture, des cellules ostéoblastiques sont capables de sécréter du VEGF en réponse à une stimulation au bFGF [Tokuda et al., 2000]. Il a été montré dans une expérience *in vivo* que l'injection de 100 μ g de bFGF au niveau d'un os irradié stimule la formation osseuse [Springer et al., 2008].

Le bFGF est également un facteur angiogène et favorise la réparation tissulaire en activant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins au site de lésion tissulaire [Distler et al., 2003]. Il stimule également la prolifération des cellules endothéliales et d'autres cellules nécessaires à la réparation tissulaire, comme les ostéoblastes pour la réparation du tissu osseux.

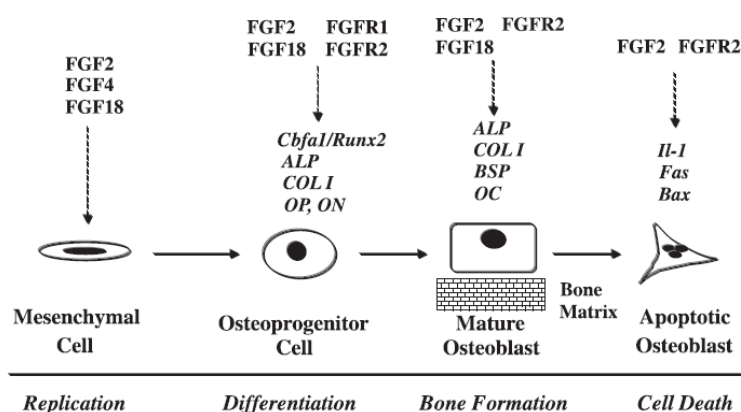


Figure 28. Régulation de l'expression de facteurs ostéoblastiques par la voie de signalisation FGF/FGFR lors de l'ostéogenèse [Marie, 2003].

- *Insulin-like Growth Factor (IGF)*

Les IGFs sont des petits polypeptides de poids moléculaire égal à 7,6 kDa. Deux IGFs ont été caractérisés ; l'IGF-1 et l'IGF-2. Ces facteurs de croissance sont présents dans de nombreux tissus dont le tissu osseux au sein duquel les IGFs régulent localement le métabolisme. *In vitro*, les IGFs stimulent la réplication des cellules de la lignée ostéoblastique de manière dépendante de la production de NO [Lagumdzija et al., 2004] et augmentent la synthèse du collagène et d'autres protéines matricielles. Lorsque le gène codant pour le récepteur à l'IGF-1 est déficient, le volume d'os spongieux diminue significativement et le dépôt de minéralisation dans la matrice ostéoïde est limitée [Zhang et al., 2002]. La PTH et les agents qui augmentent les taux d'AMPc dans les cellules osseuses, en stimulant l'adénylate cyclase, sont les principaux inducteurs de la synthèse de l'IGF-I. Les facteurs de croissance ayant des propriétés mitogènes comme le bFGF et le PDGF, inhibent la synthèse des IGFs par les ostéoblastes. Cet effet est corrélé avec une diminution de la différenciation des ostéoblastes.

Le lien entre le VEGF et l'IGF a été établi en 1997 avec les travaux de Wang et al (Figure 25) [Wang et al., 1997]. Cette étude a montré qu'en présence de cellules endothéliales, les ostéoblastes libèreraient du VEGF qui va alors activer les récepteurs KDR et Flt-1 des cellules endothéliales. En réponse au VEGF produit, les cellules endothéliales sécrèteraient de l'IGF-1 et de l'ET-1 qui stimuleraient ainsi la fonction des ostéoblastes et probablement l'augmentation de la PAL et de l'ostéocalcine. [Wang et al., 1997].

- *Transforming Growth Factor β (TGF β)*

Le TGF β , dont le poids moléculaire est de 25 kDa, existe sous trois isoformes : TGF β -1, TGF β -2, et TGF β -3. C'est un polypeptide multifonctionnel produit par de nombreux types de cellules dont les cellules immunitaires mais aussi par les cellules osseuses et endothéliales. Après sa sécrétion, il peut agir directement *via* ses récepteurs de type I et II (TGF β RI et TGF β RII) ou être stocké dans la matrice extracellulaire osseuse jusqu'à sa libération lors du processus de résorption. Le rôle de TGF β est assez controversé puisque cette cytokine peut avoir des fonctions opposées selon le type cellulaire et son stade de différenciation.

Des souris déficientes en TGF β -1, TGF β -2, ou encore en TGF β RI ou RII meurent *in utero* du fait d'une vascularisation anormale [Lebrin et al., 2005]. Le TGF β peut agir sur l'angiogenèse mais va induire deux effets différents suivant la voie de signalisation activée. Dans les cellules endothéliales, le récepteur de type I (TGF β RI) existe principalement sous deux formes : ALK 1 et ALK 5 (activin receptor-like kinase 1 et 5). L'activation de ALK 1 induit la phosphorylation de Smad 1/5 qui stimule la synthèse de Id-1 qui va alors activer la prolifération et la migration des cellules endothéliales. A l'opposé, l'activation de ALK 5 entraîne la phosphorylation de Smad 2/3 et la synthèse de fibronectine et de PAI-1 qui vont inhiber les processus d'angiogenèse [Goumans et al., 2003].

Un modèle de co-culture entre des cellules mésenchymateuses et des cellules endothéliales stimule l'activation de TGF β et active la différenciation des cellules mésenchymateuses en péricytes et cellules musculaires lisses, acteurs de la formation de vaisseaux sanguins [Lebrin et al., 2005]. Le TGF β -1 entraîne également la libération de VEGF par des

ostéoblastes qui peut alors activer les cellules endothéliales et l'angiogenèse nécessaire à la réparation osseuse [Saadeh et al., 1999].

Le TGF β est un élément central du processus de remodelage osseux. Il stimule les cellules de la lignée ostéoblastique en inhibant l'apoptose des ostéoblastes et en induisant leur différenciation en ostéocytes [Chua et al., 2002; Dufour et al., 2008].

Le TGF β exerce aussi plusieurs rôles sur la fonction des ostéoclastes. Quinn et al. ont montré que le TGF β pourrait stimuler la différenciation des précurseurs ostéoclastiques. Néanmoins, en présence d'ostéoblastes, le TGF β est capable d'inhiber la production de RANKL par les ostéoblastes et inhiberait l'activation des ostéoclastes matures par ce facteur [Quinn et al., 2001]. Ishida et al. ont quant à eux mis en évidence que le TGF β -1 stimule la sécrétion de RANKL par les cellules endothéliales et non par les ostéoblastes [Ishida et al., 2002].

- *L'endothéline-1 (ET-1)*

L'endothéline-1 est un peptide synthétisé par de nombreux types cellulaires tels que les cellules endothéliales ou les cellules musculaires lisses. Elle agit de manière autocrine ou paracrine et intervient dans la régulation du tonus vasculaire en stimulant la vasoconstriction. L'ET-1 peut également agir sur les cellules ostéoblastiques qui expriment le récepteur à l'ET-1 et peut alors avoir une influence sur le métabolisme osseux. En effet, il a été montré que ET-1 peut stimuler la synthèse d'ostéonectine, facteur de transcription impliqué dans la différenciation ostéoblastique, ce qui va favoriser la formation osseuse [Saniger et al., 2006]. Il a aussi été suggéré que ET-1 peut activer l'activité ostéoblastique en bloquant dickkopf homolog 1 (Dkk1), un inhibiteur de la voie Wnt [Clines et al., 2007]. L'ET-1 peut également avoir un effet inhibiteur de la différenciation ostéoblastique en diminuant le taux de connexines 43 et la formation de jonctions communicantes [Niger et al., 2008]. Enfin, comme cela est présenté dans la Figure 25, Wang et al. avaient identifié qu'une co-culture entre ostéoblastes et cellules endothéliales stimulait la sécrétion de VEGF qui agirait sur les cellules endothéliales *via* leurs récepteurs 1 et 2 et activerait la synthèse de ET-1 [Wang et al., 1997].

- *Le Stromal Derived Factor-1 (SDF-1)*

Le SDF-1 (ou CXCL12) est une chimiokine, cytokine à fort pouvoir chimioattractant, dont le récepteur unique est le CXCR4. Le SDF-1 est essentiel pour le développement du système nerveux central, des vaisseaux sanguins ou encore des systèmes immunitaire et hématopoïétique [Wright et al., 2005; Zheng et al., 2007]. Il est exprimé par les cellules mésenchymateuses, les ostéoblastes immatures et les cellules endothéliales vasculaires.

Il est montré dans la Figure 17 que le SDF-1 joue un rôle important dans le recrutement des cellules progénitrices qui se différencient et se dirigent vers le site de formation osseuse grâce à la circulation sanguine. Récemment, Otsuru et al. ont démontré que les cellules endothéliales présentes sur le site de formation osseuse sont à l'origine de la sécrétion de SDF-1 et du recrutement des progéniteurs ostéoblastiques circulants [Otsuru et al., 2008]. De la même manière, SDF-1 est capable de stimuler le recrutement de progéniteurs de la

lignée ostéoclastique et de favoriser les étapes précoces de leur différenciation (la fusion cellulaire et l'activité de la TRAP) [Wright et al., 2005].

SDF-1 est également capable d'induire la différenciation de progéniteurs endothéliaux. En effet, des progéniteurs endothéliaux issus du tissu adipeux mis en co-culture avec des cellules endothéliales qui sécrètent du SDF-1, se différencient spontanément en cellules endothéliales matures capables de former des tubes dans une matrice de matrigel [Sengenès et al., 2007].

• *Hepatocyte Growth Factor (HGF)*

Le facteur de croissance HGF, synthétisé dans le microenvironnement osseux, peut jouer différents rôles. Il stimule la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en favorisant la prolifération et la migration des cellules endothéliales et leur capacité à former des structures tubulaires *in vitro* et *in vivo* [Marui et al., 2005; Nakagami et al., 2005].

Il peut également agir sur les cellules osseuses car celles-ci possèdent le récepteur à HGF (c-met). Il est en outre sécrété par les ostéoclastes [Grano et al., 1996]. Le HGF stimule la prolifération des cellules mésenchymateuses et induit leur différenciation en ostéoblastes plus particulièrement lorsqu'il est associé à la forme active de la vitamine D [Schiller et al., 2001]. Associé à de l'hydroxyapatite, il est capable de stimuler la différenciation ostéoblastique des cellules adhérentes au biomatériau [Hossain et al., 2005].

Néanmoins, dans un contexte pathologique, les cellules cancéreuses synthétisent du HGF qui stimule la prolifération des cellules mésenchymateuses mais inhibe la différenciation ostéoblastique induite par les BMPs [Standal et al., 2007]. Par son pouvoir chimioattractant, il stimule également l'invasion des cellules tumorales.

• *L'oxide nitrique (Nitric Oxide, NO)*

L'oxide nitrique est connu pour être un agent vasodilatateur sécrété par les cellules endothéliales en réponse à un stress biochimique (tel qu'après libération de la bradikinine, de la thrombine ou de l'endothéline-1) ou encore à un stress mécanique induit par les contraintes de cisaillement du flux sanguin [Rudic et al., 1998; Vanhoutte, 2003]. Les cellules osseuses, tout comme les cellules endothéliales, sont sensibles aux contraintes de cisaillement et expriment la eNOS (endothelial NO Synthase) responsable de la synthèse de NO. Après stimulation mécanique, les ostéocytes sont capables de répondre de la même manière que les cellules endothéliales et de sécréter du NO [Klein-Nulend et al., 2005].

Le NO jouerait un rôle important dans le remodelage osseux. En effet, une diminution de NO entraîne une résorption osseuse intense due à un recrutement des précurseurs ostéoclastiques plus importante, à une stimulation de leur différenciation puis de leur activité [Collin-Osdoby et al., 2000]. Suite à certains types de contraintes mécaniques, le NO peut aussi être sécrété par les cellules souches mésenchymateuses et inhiberait la production de RANKL. La différenciation ostéoclastique serait alors inhibée et la résorption osseuse diminuée [Robling et al., 2006].

C'est donc en partie par la voie du NO, sécrété par les deux types cellulaires (endothélial et ostéoblastique), que les contraintes mécaniques régulent le remodelage osseux.

3) La communication ostéo-endothéliale

La communication cellulaires entre les cellules ostéogéniques et les cellules endothéliales est un domaine de recherche qui mobilise de plus en plus d'équipes. Différents modes de communication entre ces deux lignages cellulaires ont été identifiés grâce à des études *in vitro*, à l'aide de différents modèles de co-culture, ou bien grâce à des modèles expérimentaux chez l'animal.

a) Les modèles *in vitro*

Le couplage cellulaire entre les cellules ostéoblastiques et endothéliales est étudié depuis quelques années afin de mieux comprendre le rôle de la vascularisation dans la formation osseuse, lors de l'ostéogénèse ou de la réparation [Collin-Osdoby, 1994]. L'utilisation de modèles *in vitro* de co-cultures de cellules du lignage ostéoblastique et endothélial a permis en particulier de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires sollicités dans la communication ostéo-endothéliale.

Les cellules utilisées pour ces études sont de différentes origines. Les cellules endothéliales peuvent être d'origine humaine, comme les HUVECs, issues de la veine du cordon ombilical [Athanasopoulos et al., 2007; Guillotin et al., 2004; Villars et al., 2002], des cellules endothéliales issues de micro-vaisseaux présents dans la peau (HDMECs) [Kaigler et al., 2005], des cellules issues de la veine saphène (HSAVECs) ou encore des progéniteurs endothéliaux isolées à partir du sang de cordon ombilical [Guillotin et al., 2004]. Les cellules endothéliales peuvent également être d'origine bovine et provenir de prélèvements de capillaires [Bouletreau et al., 2002a].

Concernant les cellules ostéoblastiques, l'origine humaine est à ce jour de plus en plus privilégiée même si des cellules murines ont été largement utilisées. Les ostéoblastes peuvent être matures, issus de culture primaire de calvaria de rat [Bouletreau et al., 2002b] ou issus de prélèvements humains [Athanasopoulos et al., 2007; Stahl et al., 2004].

Enfin, les progéniteurs ostéoblastiques issus de cellules mésenchymateuses de moelle osseuse font l'objet d'un intérêt croissant et sont utilisés dans de nombreuses études [Meury et al., 2006; Rouwkema et al., 2006; Villars et al., 2000].

Quatre modèles d'études de cette communication cellulaire se détachent de ces différentes études :

- les cellules ostéoblastiques et endothéliales peuvent être en contact direct, cultivées dans le même système (bidimensionnel Figure 30 A ou tridimensionnel Figure 30 B), et en présence du même milieu. La co-culture directe permet l'établissement de jonctions inter-cellulaires et l'étude de la communication cellulaire véhiculée par ces jonctions (Figure 29) [Kaigler et al., 2005; Rouwkema et al., 2006; Villars et al., 2002; Wang et al., 1997];

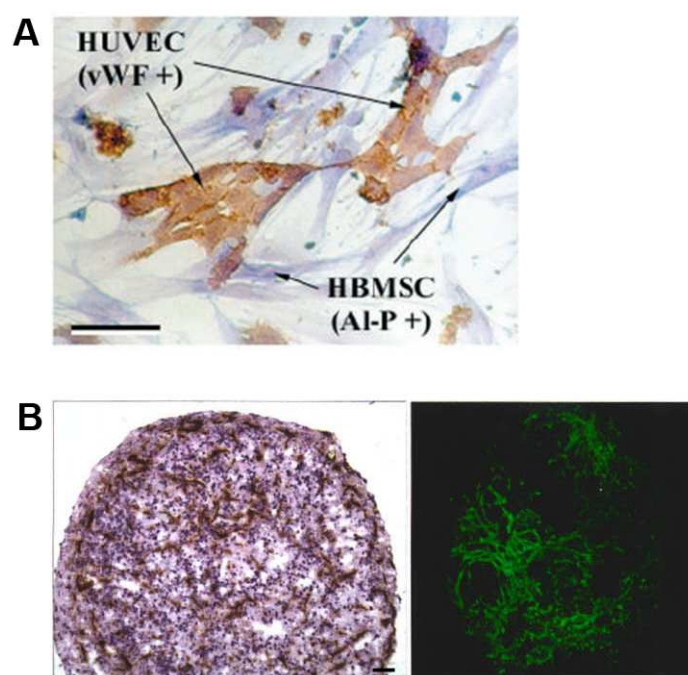


Figure 29. Co-culture en contact direct de cellules endothéliales et ostéoblastiques.

A : Co-culture de cellules endothéliales marquées par la reconnaissance du vWF (marron) et cellules ostéoprogénitrices visualisées par l'activité de la PAL (bleu) [Villars et al., 2002].

B : Sphéroïde créée par des cellules mésenchymateuses en co-culture avec des cellules endothéliales [Rouwkema et al., 2006]. Les barres d'échelle représentent 100µm. Des cellules mésenchymateuses et des cellules endothéliales sont mises en co-culture dans un tube à fond conique et des sphéroïdes se forment spontanément. Le marquage anti-CD31 (marron à gauche ou en vert en droite) et le marquage des noyaux (bleu) montre la formation d'une pré-vascularisation par les cellules endothéliales dans ces sphéroïdes, après 10 jours de culture.

Barres d'échelle = 100µm.

- les cellules peuvent être cultivées dans le même milieu de culture mais séparées par une membrane semi-perméable laissant passer les facteurs solubles mais ne permettant pas le contact cellulaire. Cette co-culture indirecte permet la communication des deux types cellulaires par la sécrétion de facteurs uniquement et permet d'identifier le rôle de ces facteurs agissant sur l'un ou l'autre modèle cellulaire [Clarkin et al., 2007; Villars et al., 2000];
- les cellules d'un type donné peuvent être cultivées séparément et leur milieu de culture sera prélevé à différents temps d'études puis incubé en présence des cellules de l'autre type. Cette technique des milieux conditionnés permet l'étude de l'influence des facteurs solubles sécrétés par l'un des types cellulaires sur l'autre type [Athanasopoulos et al., 2007; Deckers et al., 2002] ;
- enfin, les cellules peuvent être cultivées sur la matrice extracellulaire produite par l'autre type cellulaire afin d'étudier l'influence des composants de la matrice sur le comportement cellulaire [Kaigler et al., 2005; Villars et al., 2000].

Les résultats de ces études vont toutes dans le sens d'une régulation de la fonction ostéoblastique par les cellules endothéliales. Bouletreau et al. ont montré que les cellules endothéliales stimulées par du VEGF et/ou en conditions hypoxiques sont capables de sécréter de la BMP2, pouvant ensuite améliorer la capacité ostéoformatrice des ostéoblastes lors de la réparation d'une fracture [Bouletreau et al., 2002a]. De même, lorsque les ostéoblastes sont stimulés par du PDGF associé ou non à des conditions hypoxiques, ces cellules synthétisent du VEGF [Bouletreau et al., 2002b]. Villars et al. [Villars et al., 2002] ainsi que Kaigler et al. [Kaigler et al., 2005] ont montré que la co-culture directe entre des ostéoprogéniteurs issus de la différenciation des cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine et des HUVECs entraîne une augmentation du taux de PAL, marqueur de la différenciation ostéoblastique.

A l'inverse, les ostéoblastes peuvent aussi influencer la fonction endothéliale, notamment la fonction angiogène. Après incubation des ostéoblastes avec différentes isoformes de BMPs, la sécrétion de VEGF est détectée dans le milieu de culture qui pourra ensuite activer la migration des cellules endothéliales [Deckers et al., 2002].

Les ostéoblastes soumis à la stimulation par le VEGF peuvent aussi sécréter du CYR61 (CCN1), une protéine jouant un rôle à la fois sur l'angiogenèse et l'ostéogenèse [Hadjigargyrou et al., 2000; Leu et al., 2002]. Cette protéine peut être présente à la fois liée à la matrice extracellulaire par l'héparine et à la surface cellulaire. Sécrété par les ostéoblastes, le CCN1 peut activer la migration des cellules endothéliales et leur capacité à former des structures en capillaire dans du Matrigel [Athanasopoulos et al., 2007].

L'étude menée par Clarkin et al. en co-culture indirecte, [Clarkin et al., 2007] démontre qu'une exposition des cellules ostéoblastiques à la prostaglandine PGE2 induit une sécrétion de VEGF. Ce VEGF serait alors capable d'activer la phosphorylation de ERK *via* VEGFR-2 dans les cellules endothéliales qui sécrèteraient alors la PGE2 (Figure 30).

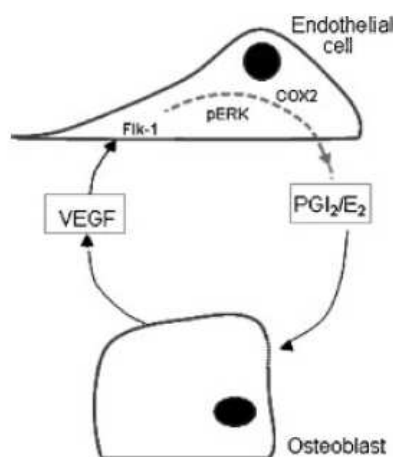


Figure 30. Communication cellulaire entre ostéoblastes et cellules endothéliales [Clarkin et al., 2007].

En conclusion, ces modèles *in vitro* ont permis de montrer que les cellules endothéliales et les cellules ostéogéniques sont capables de communiquer entre elles et d'influencer leur différenciation, migration ou prolifération. Le VEGF est au centre de ce mode de communication paracrine. Cependant, les travaux de la littérature montrent qu'il existe d'autres modes de communication faisant intervenir les jonctions cellulaires telles que les jonctions adhérentes sollicitant les cadhérines, communication cellulaire encore peu connue dans le modèle ostéo-endothélial.

b) Les modèles *in vivo*

Quelques études réalisées *in vivo* ont permis de mieux comprendre la relation entre les vaisseaux sanguins et le tissu osseux [Kanczler and Oreffo, 2008].

Tout d'abord, l'importance de la vascularisation a été établie dès lors que des études ont rapporté le développement de pathologies osseuses lors de déficiences vasculaires. Les études histomorphométriques réalisées par Burkhardt et al. ont démontré la diminution de la vascularisation dans le cas d'ostéoporose qu'elle soit liée ou non au vieillissement. Cette diminution concerne la taille et le nombre non seulement des éléments capillaires, mais aussi des segments artériolaires. Cette diminution est parallèle à une diminution du volume osseux et de la surface des travées osseuses [Burkhardt et al., 1987].

Les travaux de Hunter et al. ont démontré la synergie évolutive entre ostéogenèse et angiogenèse dans le cas du rachitisme : l'absence de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ s'accompagne non seulement d'une diminution de l'ossification endochondrale avec une prolifération anarchique du cartilage qui demeure avascularisé, mais également d'une atteinte vasculaire tant morphologique, histologique, que fonctionnelle, en périphérie du cartilage. Ces phénomènes sont parfaitement réversibles, avec un retour à la normale, coordonné dans le temps dès l'adjonction de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [Hunter et al., 1991].

Dans le cas de la maladie de Paget, le couplage résorption / reconstruction osseuses est perturbé et anarchique, et cette pathologie s'accompagne d'un développement local anormalement élevé et non structuré de la vascularisation artério-veineuse avec la possibilité de retour veineux au niveau des artères à l'origine de graves perturbations hémodynamiques [Tarquini et al., 1998].

Quelques modèles de génétique expérimentale ont montré le rôle de certains facteurs dans la coopération ostéo-endothéliale (Knock Out, Knock Down) [Athanasopoulos et al., 2007; Street et al., 2002; Zelzer et al., 2004]. L'invalidation de deux types de facteurs, angiogènes comme le VEGF ou le bFGF, et ostéogènes comme la BMP-2 ou Cbfa1/Runx-2, conduit aussi bien à des anomalies vasculaires, des pathologies osseuses comme l'ostéopétrose ou encore des maladies osseuses métastatiques et des pertes osseuses liées à des problèmes inflammatoires [Shiozawa et al., 2008].

L'invalidation du gène codant pour la Cx43 conduit à des malformations cardiaques sévères provoquant la mort prématurée des souriceaux Cx43^{-/-} par asphyxie. Par ailleurs, les souris Cx43^{-/-} présentent d'importants retards d'ossification, particulièrement au niveau craniofacial du fait d'un dysfonctionnement ostéoblastique [Lecanda et al., 1998]. La culture *in vitro* des

ostéoblastes issus de ces animaux Cx43^{-/-} montrent une augmentation de la Cx45 mais qui n'est pas suffisante à rétablir le couplage jonctionnel. Cette réduction de la communication cellulaire est par ailleurs corrélée avec une diminution d'expression des marqueurs spécifiques de l'ostéoblaste (PAL, collagène de type I, OC) ainsi qu'un défaut de minéralisation [Lecanda et al., 2000].

En conclusion, aussi bien les modèles physiopathologiques que les modèles issus de génétiques expérimentales démontrent le rôle de la vascularisation sur la néo-formation osseuse. Ce mode de régulation de la physiologie osseuse doit à ce jour être pris en compte pour développer de nouvelles stratégies de reconstruction osseuse dont les objectifs seront présentés dans le paragraphe suivant. Enfin, une bonne connaissance des mécanismes de la réparation naturelle, notamment la relation entre l'os, le cartilage hypertrophique et les vaisseaux, est tout aussi nécessaire pour le développement de méthodes innovantes de reconstruction du tissu osseux.

III. La réparation du tissu osseux

A. Mécanismes physiologiques de la réparation naturelle

1) L'ossification intramembranaire et endochondrale

Lors de l'ostéogenèse ou d'un processus de réparation du tissu osseux, on distingue deux types d'ossifications : intramembranaire ou endochondrale.

L'ossification intramembranaire est à l'origine des os plats et se développe à partir d'une ébauche de cellules mésenchymateuses qui se différencient directement en ostéoblastes. Les capillaires envahissent ce bourgeon osseux et les ostéoblastes déposent une matrice qui donne naissance à des spicules osseux. Ces spicules se développent et fusionnent pour former de l'os trabéculaire qui contient alors une forte proportion d'ostéocytes.

L'ossification endochondrale est à l'origine des os longs et se développe à partir d'une ébauche cartilagineuse (Figure 31). Les cellules mésenchymateuses se condensent, se différencient en chondrocytes et forment un cartilage avasculaire. En surface du manchon cartilagineux, les cellules forment le périchondre, futur réservoir d'ostéoprogéniteurs. Puis, au centre, les chondrocytes cessent de proliférer et deviennent hypertrophiques. Ils provoquent alors la minéralisation de leur matrice extracellulaire dans laquelle le VEGF qu'ils sécrètent est séquestré. Dans le même temps, les chondrocytes stimulent la différenciation des cellules du périchondre en ostéoblastes qui synthétisent une matrice et constituent le premier centre d'ossification (le périoste). Puis, les chondroclastes dégradent la matrice minéralisée du cartilage hypertrophique et libèrent ainsi le VEGF [Gerber and Ferrara, 2000]. Le processus d'angiogenèse est alors activé et entraîne l'apoptose des chondrocytes hypertrophiques. Enfin, la dégradation de cette matrice hypertrophique, laisse place à la moelle osseuse. L'ossification endochondrale se poursuit de façon centrifuge vers les futures épiphyses dans lesquelles apparaîtront les points secondaires d'ossification. La régulation synchronisée entre la prolifération, l'hypertrophie et l'apoptose des chondrocytes et l'angiogenèse permet ainsi la croissance des os longs.

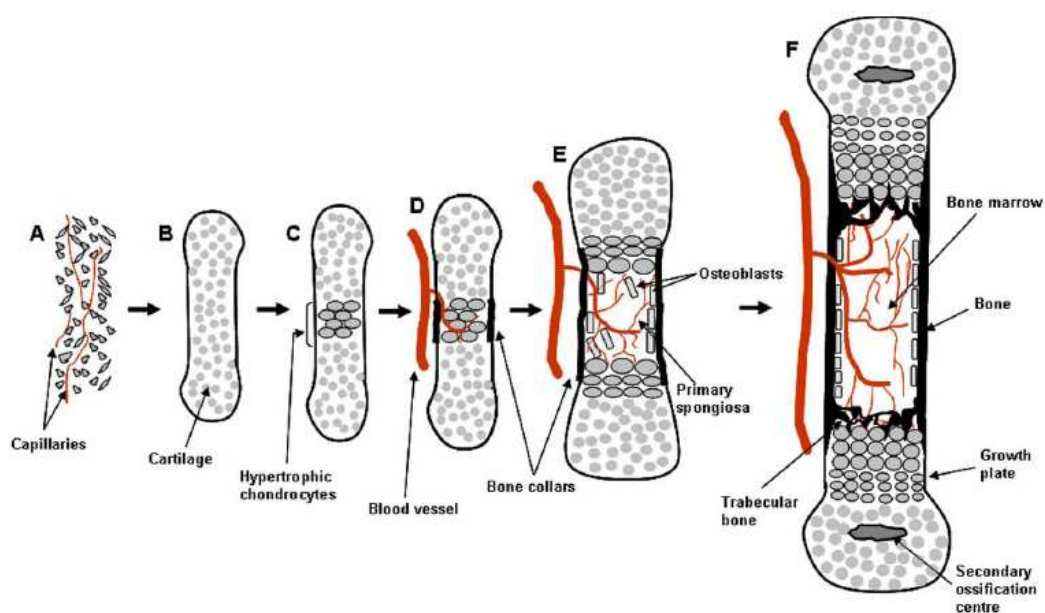


Figure 31. La vascularisation lors de l'ossification endochondrale [Kanczler and Oreffo, 2008].

L'ensemble de ces données confirme le lien étroit qui s'établit entre les cellules ostéoarticulaires (ostéoblastes, chondrocytes) et les cellules endothéliales pour assurer les événements séquentiels de l'ossification endochondrale. Ces différents événements sont sous le contrôle de facteurs endogènes ou exogènes de différentes natures.

Plus précisément, l'environnement mécanique, cellulaire et biochimique joue un rôle essentiel dans les mécanismes de réparation du tissu osseux, par les différents signaux moléculaires et intracellulaires qu'ils peuvent générer. Cette signalisation cellulaire, quel que soit le signal inducteur (de nature biomécanique ou biochimique) est à l'origine d'une modulation des activités métaboliques des cellules osseuses et des cellules environnantes dont les cellules endothéliales. Ceci a une conséquence directe sur la néo-formation osseuse, sur la vascularisation du tissu osseux, sur son remodelage et donc, sur les propriétés mécaniques de l'os reconstruit. Il est donc essentiel d'identifier les principaux acteurs mécaniques, biochimiques et le micro-environnement cellulaire qui peuvent contrôler la régénération osseuse.

2) Rôle du microenvironnement fracturaire

a) L'environnement biochimique et cellulaire

Il est important de rappeler que la réparation naturelle d'un tissu est toujours précédée d'une succession de mécanismes qui incluent une réaction inflammatoire avec une sécrétion de cytokines inflammatoires qui jouent un rôle prépondérant dans les mécanismes de néo-vascularisation du tissu lésé et le recrutement de différents types cellulaires sollicités dans la reconstruction du tissu (Figure 32).

En effet, après une effraction tissulaire qui peut être due à une lésion tissulaire ou à l'implantation de biomatériaux, se produit une étape de coagulation avec la création d'un hématome. La sécrétion de kinines est primordiale pour activer la synthèse de molécules actives comme le NO qui va agir sur le tonus vasculaire. La réponse inflammatoire en réponse à la lésion tissulaire intervient après l'activation du système du complément et la sécrétion de molécules chimiotactiques permettant la mobilisation de cellules souches au site de lésion. Des cellules phagocytaires comme les macrophages ou les granulocytes sont donc recrutées et permettent l'étape de détersion puis la synthèse de collagène par des fibroblastes donne naissance au tissu de granulation ou tissu fibreux. Mais ce tissu n'est pas permanent et doit être remodelé pour laisser la place au tissu néo-formé. Des enzymes telles que les MMPs et des cytokines comme les interleukines sont libérées et stimulent la dégradation de ce tissu fibreux. Puis deux processus peuvent intervenir : la néo-angiogenèse du tissu ou une persistance de la fibrogenèse entraînant une fibrose et une réaction inflammatoire chronique (obligeant le retrait de l'implant s'il a eu lieu).

Lorsque la réparation est guidée par un biomatériau, celui-ci doit interagir le plus activement possible avec le microenvironnement du tissu hôte et au mieux influencer la néo-angiogenèse par la libération de molécules actives [Carano and Filvaroff, 2003]. De même, la colonisation du biomatériau doit être favorisée pour permettre la bio-intégration de substitut.

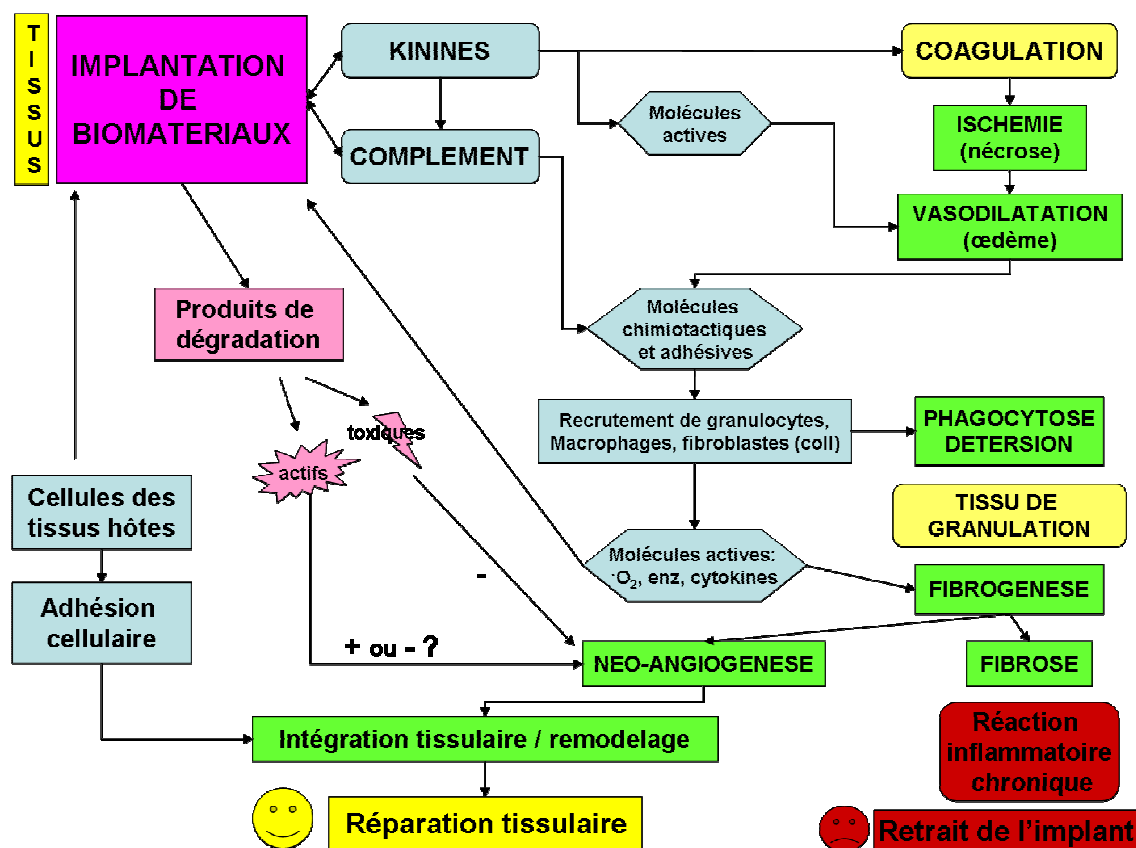


Figure 32. Mécanismes sollicités dans la réparation tissulaire après lésion tissulaire ou implantation de biomatériaux, (d'après Charles Baquey, données personnelles).

Ainsi, l'environnement cellulaire, la présence des cellules souches recrutées au site fracturaire, qu'elles soient de nature hématopoïétique ou mésenchymateuse, les interactions cellulaires qu'elles peuvent établir ensemble (voir paragraphe II.B.1.) ainsi que les facteurs biochimiques produits par ces différents types cellulaires jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de réparation du tissu osseux (Figure 32).

Les principaux facteurs locaux ou systémiques nécessaires au recrutement des cellules ostéoformatrices et à la reconstruction d'un tissu osseux vascularisé fonctionnel ont été décrits dans les paragraphes I.D.2.b. et II.B.2.c.

Nous nous attacherons ici à présenter les principales molécules impliquées dans l'inflammation qui jouent un rôle fondamental dans les mécanismes de reconstruction tissulaire.

Les interleukines (IL) sont les principales molécules inflammatoires impliquées dans le processus de réparation. L'IL-1 libérée par les monocytes, mais également par les ostéoblastes, est un puissant stimulateur des ostéoclastes, en favorisant la prolifération des progéniteurs, et leur différenciation en cellules matures. L'IL-1 favorise la résorption ostéoclastique de façon directe mais aussi indirecte. Une partie de ses effets pourrait résulter d'une production de prostaglandines. L'IL-1 pourrait activer les cellules matures multinucléées, probablement *via* les cellules de la lignée ostéoblastique sachant qu'elle favorise la synthèse de l'IL-6 par les cellules stromales.

L'IL-6 est une cytokine pleiotropique ayant d'importants effets sur l'activité des cellules osseuses. Elle est exprimée et sécrétée par ces cellules en réponse aux hormones ostéotropiques comme la PTH, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, et l'IL-1. L'ostéoclaste est la source la plus importante d'IL-6 dont l'effet principal est de stimuler la résorption osseuse en augmentant le recrutement des cellules de la lignée ostéoclastique et en stimulant la différenciation ostéoclastique.

Le TNF (Tumor Necrosis Factor) est fonctionnellement relié à l'IL-1, et son effet sur l'os est synergique de celui de l'IL-1. Le TNF stimule la prolifération des progéniteurs ostéoclastiques, favorise la fusion des précurseurs en cellules multinucléées et active ces cellules multinucléées pour résorber l'os, vraisemblablement de façon indirecte *via* les cellules de la lignée ostéoblastique. De façon plus précise, le TNF- α , est une cytokine connue pour ses actions cytotostatiques, cytolytiques et antivirales. Il favorise la résorption osseuse ainsi que la réplication des cellules osseuses.

b) L'environnement mécanique

• Les différents types de contraintes dans le tissu osseux

Les contraintes appliquées à l'os sont de différentes nature : il s'agit de forces de tension, d'étirement, de compression ou encore de contraintes de cisaillement engendrées par le mouvement des fluides déplacés lors de la déformation du tissu osseux (Figure 33) [Rubin et al., 2006]. C'est pourquoi parmi les différents modèles *in vitro* utilisés (clinostats, flexercell II), de nombreux travaux de la littérature rapportent la réponse biochimique des cellules après stimulation à des contraintes de cisaillement à l'aide de chambre de flux [Bakker et al., 2001; Chen et al., 2000; Jessop et al., 2002; Klein-Nulend et al., 1998; Silverman et al., 1999].

Cependant, quel que soit le modèle utilisé, le régime de contraintes, l'amplitude, la fréquence, la durée mais aussi le mode d'application de la charge mécanique qui peut être continu (absence de phase de repos) ou intermittent (alternance de contraintes et de phase de repos) entraînent des effets différents sur la fonction des cellules osseuses (et vasculaires), sur l'activation des voies de signalisation intracellulaire et en conséquence, sur la réponse biologique des cellules cibles (prolifération, différenciation, ...).

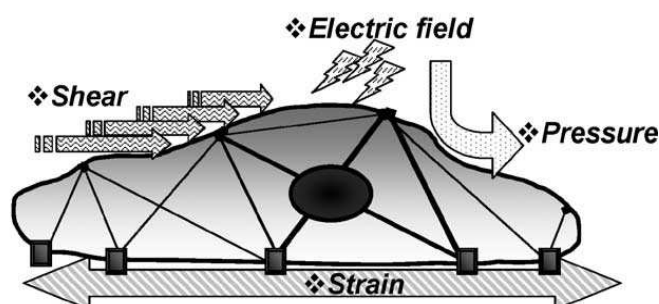


Figure 33. Forces mécaniques dans l'environnement cellulaire [Rubin et al., 2006].

Le tissu osseux peut être soumis à plusieurs types de stimulation mécanique : des forces de tension (strain), des forces de compression (pressure), des forces créées par des champs électriques (electric field) ou des forces de cisaillement (shear).

• *Les cellules « mécanosensibles »*

Les cellules osseuses sont capables de recevoir et de transmettre ces différents signaux mécaniques grâce à la présence de plusieurs mécanorécepteurs à leur membrane, comme des canaux ioniques ou encore les intégrines (Figure 34). De plus, l'organisation du cytosquelette et de la plaque d'adhésion représentent des acteurs possibles de la transformation du signal mécanique en signal biochimique [Charras and Horton, 2002]. Les jonctions communicantes existant entre les ostéocytes (Figure 34 et Figure 35A et C) et entre les ostéoblastes (Figure 34 et Figure 35A et D) peuvent transmettre mais aussi amplifier le signal induit après stimulation mécanique.

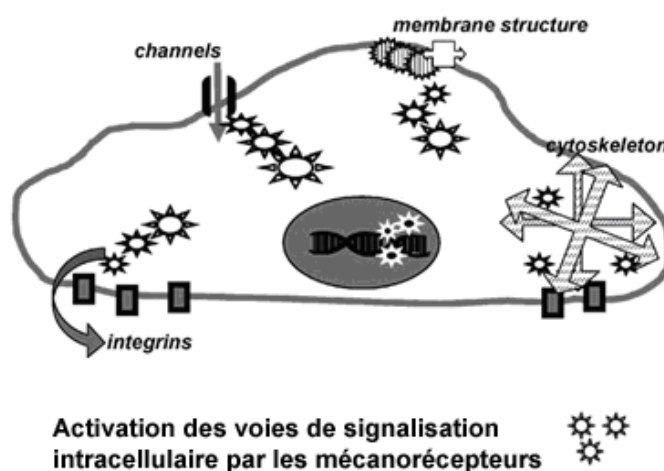


Figure 34. Les mécanorécepteurs des ostéoblastes [Rubin et al., 2006].

Robling et al. ont décrit les signaux moléculaires activés dans la mécanotransduction induite par les contraintes de cisaillement sur les différentes cellules du lignage ostéoblastique : les ostéoblastes (Figure 35 B), les ostéocytes (Figure 35 C), et les cellules mésenchymateuses (Figure 35 D).

Dans le cas des ostéocytes, une stimulation mécanique provoquerait un influx de calcium extracellulaire vers l'intérieur de la cellule (Figure 35C). De l'énergie, sous forme d'ATP, serait alors libérée et activerait des récepteurs purinergiques ionotropiques P2X et métabotropiques P2Y qui vont à leur tour activer la voie PLC-PIP₂-IP₃.

En ce qui concerne les cellules de la lignée ostéoblastique (Figure 35D), ces mouvements liquidiens, outre la déformation directe des membranes cellulaires qu'ils entraînent, induisent la génération de potentiels électriques dont on suspecte un effet direct sur l'activité des cellules osseuses. De l'ATP serait libéré par les ostéocytes et entraînerait la sécrétion de PGE2 qui va stimuler la formation osseuse en agissant sur les ostéoblastes. La voie Wnt, stimulée lors de la libération d'ATP, induirait la translocation au noyau de β -caténine via les récepteurs LRP5 et Frizzled et pourrait ainsi stimuler une néo-formation osseuse.

Enfin, la troisième cible de ces contraintes de cisaillement concerne les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse. En effet, le mouvement des fluides

intercellulaires engendré par les contraintes mécaniques entraînerait l'augmentation de la pression hydrostatique dans la moelle osseuse qui agit sur les cellules souches mésenchymateuses [Robling et al., 2006; Simmons et al., 2003] (Figure 35B). Le principal médiateur de cette signalisation serait l'oxide nitrique (NO), il pourrait être sécrété après stimulation de la NO synthase (NOS) (Figure 35B).

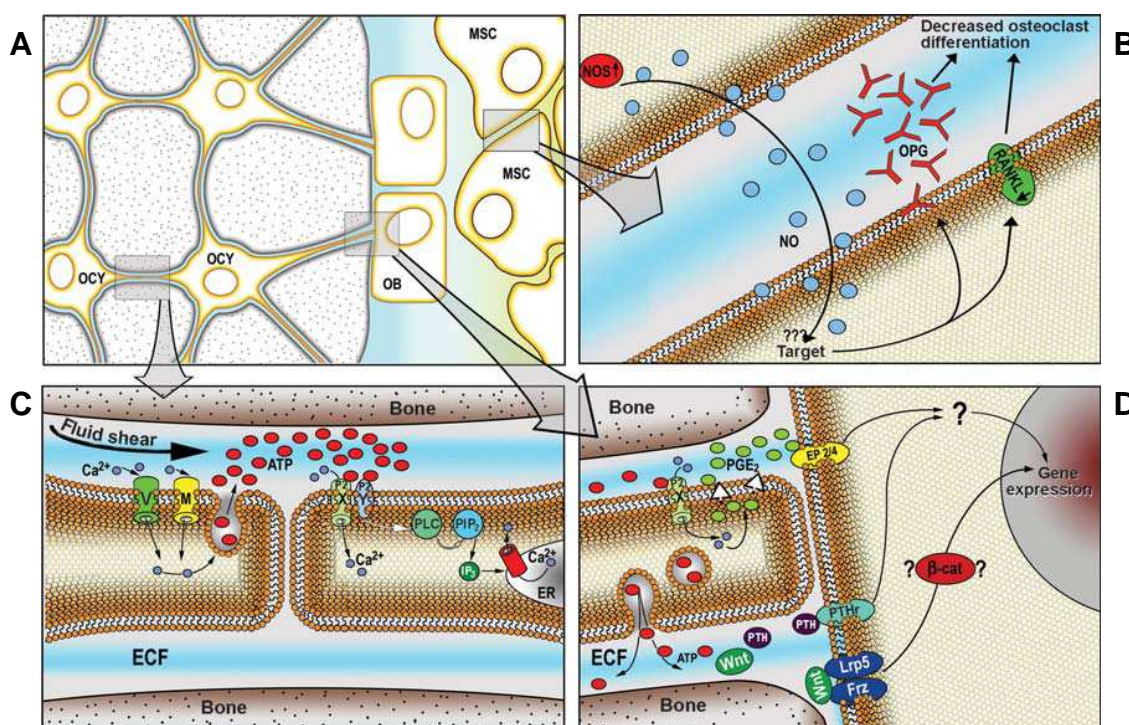


Figure 35. Les contraintes mécaniques appliquées aux ostéocytes, ostéoblastes et cellules souches mésenchymateuses [Robling et al., 2006].

• Contraintes mécaniques et réparation du tissu osseux

La réponse du tissu osseux à une stimulation mécanique est un phénomène biologique fondamental qui permet au squelette de s'adapter aux contraintes environnementales auxquelles il est soumis. Frost [Frost, 1983] fut le premier à proposer un système régulateur, qu'il nomma "mécanostat", présent dans le tissu osseux, pour ajuster en permanence la masse et l'architecture osseuse aux contraintes mécaniques imposées au squelette.

Ainsi, le tissu osseux s'adapte aux modifications de son environnement mécanique par :

- Une perte de masse osseuse associée à des troubles de minéralisation en cas de diminution de la charge mécanique (en cas d'immobilisation);
- Une stimulation de la formation et néo-formation osseuse en cas d'augmentation de la charge mécanique (lors d'exercices physiques).

Associé à ces mécanismes d'adaptation du remodelage, l'incidence des contraintes mécaniques sur la vascularisation osseuse commence à être mieux connue. Faure et al. ont

montré que l'expression du VEGF par les ostéoblastes et sa présence sous forme soluble ou liée à la matrice est régulée par les contraintes mécaniques [Faure et al., 2008]. De plus, le gain osseux induit par la course chez le rat s'accompagnerait d'une angiogenèse osseuse, prévenue par l'administration d'anticorps anti-VEGF et à l'inverse, l'ostéoporose d'immobilisation s'accompagnerait d'une régression du lit vasculaire osseux.

Ainsi, d'un point de vue clinique, ces connaissances amènent les chirurgiens orthopédiques à inciter le retour à l'exercice physique le plus rapidement possible pour leur patient ayant subi une intervention ou une fracture.

B. Réparation du tissu osseux guidée par les biomatériaux

1) Le concept d'ingénierie tissulaire

Si le tissu osseux est un tissu conjonctif capable de se réparer naturellement, dans le cas de pertes osseuses trop importantes (maladie congénitale, traumatisme, exérèse de tumeur), les chirurgiens doivent avoir recours à d'autres stratégies de reconstruction ou de comblement osseux.

De plus, la moyenne d'âge de la population mondiale est en constante augmentation et le nombre de fractures augmente lui aussi. A titre d'exemple, le nombre de fractures de hanches pourrait passer de 1,7 millions en 1990 à 6,3 millions dans les années 2050 [Siegbahn et al., 2005]. En outre, les conséquences de ce type de fracture sont extrêmement lourdes : 10 à 20% des patients décèdent, 20 à 60% retrouvent leur niveau initial d'indépendance, 15 à 25% entrent en institution médicalisée et 25 à 35% rejoignent leur domicile mais restent dépendants d'une aide. Le remplacement des pertes massives du tissu osseux reste donc un enjeu d'actualité et un réel problème de santé publique.

Une des solutions pour remplacer un organe défaillant ou manquant est la greffe. On parle d'autogreffe lorsque l'organe greffé provient du même individu, d'allogreffe lorsque qu'il provient d'un individu de la même espèce et de xélogreffe lorsqu'il provient d'un individu d'une espèce différente. La disponibilité réduite des autogreffes et les risques potentiels d'ordre infectieux et immunologiques des allogreffes conduisent à la recherche d'alternatives à ces greffes osseuses. Le recours à l'implantation de biomatériaux efficaces et assurant une parfaite biosécurité pour le patient apparaît donc être une solution alternative.

Les principaux matériaux de substitution et/ou de comblement osseux actuellement utilisés (alliages métalliques, polymères, céramiques de phosphate de calcium, composites ou non) ont, à des degrés divers, une performance insuffisante due à une adaptation incomplète aux contraintes de l'environnement des tissus vivants au sein desquels ils sont intégrés. En outre, les échecs rencontrés dans le domaine de la substitution osseuse guidée par les biomatériaux sont liés à leur faible capacité de colonisation mais surtout à un défaut de vascularisation après leur implantation.

Ainsi, face aux problèmes rencontrés par ces différents types de matériaux, les techniques d'ingénierie tissulaire permettent à ce jour de développer de nouvelles stratégies de médecine régénératrice pour le remplacement d'un organe. L'ingénierie tissulaire se définit comme l'application des principes d'ingénierie et des sciences de la vie afin de développer

des substituts biologiques qui vont restaurer, maintenir ou améliorer la fonction des tissus [Stevens et al., 2005]. Ce champ interdisciplinaire combine les savoirs et les procédés venant de la physique, la biologie cellulaire, l'ingénierie chimique et les sciences de la matière. Ces disciplines proposent l'association d'une composante matricielle (le biomatériau) à une composante biologique afin de restaurer, d'améliorer ou de remplacer un organe défaillant ou un tissu lésé. L'ingénierie tissulaire tend à apporter des solutions pour le remplacement de nombreux tissus tels que les vaisseaux sanguins, le cartilage, la peau ou encore le tissu osseux.

2) Les acteurs de l'ingénierie tissulaire

Les principaux acteurs de ces techniques de reconstruction tissulaire sont présentés dans la Figure 36. L'ingénierie tissulaire propose une association de trois composantes: la matrice, les cellules « réparatrices » et des facteurs bioactifs (comme des facteurs de croissance). Ce produit de bioingénierie doit favoriser les contacts entre cellules, ainsi qu'être capable de répondre à des stimulations mécaniques. Dans ce dernier cas, la culture dans des bioréacteurs est susceptible de fournir un environnement dynamique de culture et un meilleur apport en oxygène et nutriments.

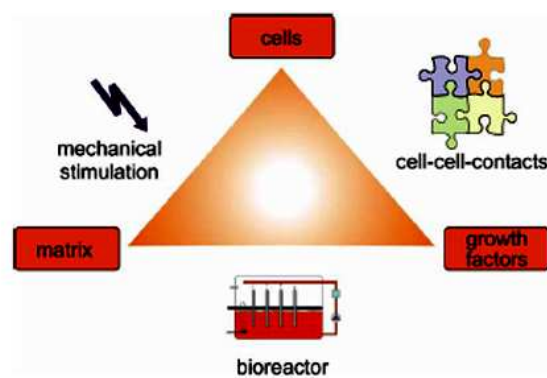


Figure 36. Les principaux acteurs de l'ingénierie tissulaire [Ashammakhi et al., 2007].

a) La composante matricielle

Les biomatériaux utilisés dans la substitution du tissu osseux doivent répondre à un cahier des charges précis qui prend en compte les caractéristiques biologiques et physico-chimiques de l'os. Jusqu'à présent, les critères pris en compte dans le choix des matériaux étaient la biocompatibilité et les propriétés mécaniques. Depuis quelques années, un autre critère est considéré, il s'agit de la bioréactivité. Les substituts osseux doivent permettre une néoformation osseuse à leur contact et aboutir à une véritable liaison chimique avec l'os. Cette propriété permet, d'une part, l'établissement de liaisons entre le matériau et le tissu osseux et d'autre part, la réhabilitation du substitut par les cellules. Les biomatériaux doivent avoir une macro et nano porosité adéquate afin de faciliter l'adhésion cellulaire, la diffusion de nutriments et la colonisation cellulaire. Idéalement, l'implant doit fournir une intégrité

structurelle aux cellules leur permettant de synthétiser leur propre matrice et doit se dégrader en même temps que le néo-tissu se forme et assure à son tour les propriétés mécaniques nécessaires. Enfin, les biomatériaux injectables sont de plus en plus privilégiés pour rendre les interventions chirurgicales les moins invasives possibles. L'obtention d'un substitut osseux réunissant les trois propriétés requises (biocompatibilité, bonnes propriétés mécaniques et bioréactivité) constitue un défi difficile à relever. Les évaluations précliniques (études *in vitro* et *in vivo*) doivent contrôler l'ensemble de ces paramètres et préciser les cinétiques de réhabilitation d'un substitut en fonction du site de reconstruction et des conditions locales d'utilisation.

Dans le cadre de l'ingénierie du tissu osseux, les principaux biomatériaux utilisés sont des alliages métalliques, des céramiques, des polymères ou des composites. Ce sont des matériaux synthétiques ou naturels dotés de propriétés mécaniques variables.

Parmi les alliages métalliques, le titane est largement utilisé pour le remplacement de la tête fémorale ou du genou [Guillemot, 2005]. Ces matériaux non cytotoxiques, sont « biotolérés » c'est-à-dire qu'ils sont intégrés dans l'os mais ne présentent aucune caractéristique bioactive et n'induisent pas de formation osseuse à leur contact [Passuti et al., 1999]. Pour pallier au manque d'ostéoconductivité, ces alliages métalliques peuvent être modifiés, fonctionnalisés par des revêtements d'hydroxyapatite [Bigi et al., 2007; Negroiu et al., 2008] ou encore par des peptides d'adhésion afin de favoriser leur colonisation cellulaire [Porte-Durrieu et al., 2004] (Figure 37).

L'hydroxyapatite est un minéral dont la formule chimique est $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Ce composé, naturellement présent dans le tissu osseux est largement utilisé pour le comblement de pertes osseuses. L'hydroxyapatite présente de nombreux avantages en termes de biocompatibilité et de porosité. La macroporosité des céramiques de phosphate de calcium permet une meilleure colonisation du matériau par les cellules, même si la vascularisation n'est souvent observée qu'à la périphérie de ces céramiques. Les phosphates de calcium favorisent l'adhésion cellulaire des ostéoprogéniteurs, leur prolifération et la synthèse d'une matrice minéralisée [Granja et al., 2005]. Néanmoins, leurs propriétés mécaniques restent faibles et très dépendantes des traitements physico-chimiques qui ont été nécessaires à leur élaboration. Les céramiques sont de plus soumises à une très faible résorption naturelle et le processus de dégradation est souvent plus long que celui de la néo-formation osseuse. Pour améliorer la cinétique de leur dégradation, l'hydroxyapatite est souvent associé à du beta tricalcium phosphate.

Les polymères d'origine synthétique ou naturelle, comme le collagène, l'acide poly-glycolique (PGA), l'acide polylactique-glycolique (PLGA), le chitosan ou encore l'alginate, sont de plus en plus utilisés en ingénierie tissulaire [Augst et al., 2006; Kaigler et al., 2006b]. De manière générale, les polymères naturels sont biodégradables et biocompatibles et permettent ainsi aux cellules de proliférer et de se différencier sans engendrer de réactions inflammatoires ou cytotoxiques qui sont souvent associées à des matériaux synthétiques [Lubiatowski et al., 2006].

Les polymères sont utilisés comme des systèmes de délivrance de molécules bioactives [Barrias et al., 2005; Keshaw et al., 2005; Ribeiro et al., 2006; San Juan et al., 2007] ou encore comme matrice permettant le transport de cellules et la néo-formation d'un tissu [Abbah et al., 2006; Alsberg et al., 2001; Thebaud et al., 2007]. En ingénierie vasculaire, le

fucoïdane est étudié pour sa capacité à retenir le VEGF₁₆₅ et à entrainer la migration des cellules endothéliales qui vont former des structures tubulaires [Lake et al., 2006].

L'alginate est un polysaccharide isolé à partir d'algues comme les *Lessonia flavicans*, *Desmarestia ligulata* ou *Desmarestia distans* [Leal et al., 2008]. Il permet en particulier l'encapsulation de cellules et/ou de molécules dans un hydrogel qui se forme après contact avec une solution contenant des polycations comme le Ca²⁺ [Evangelista et al., 2007]. La synthèse de microsphères d'alginate constitue alors un système potentiellement injectable tout en permettant la communication des cellules qui sont encapsulées.

Néanmoins, quelles que soient la nature et la structure de ces biomatériaux, ils n'offrent pas à eux seuls une parfaite bio-intégration au niveau du site receveur. Selon le principe de l'ingénierie tissulaire, ces matrices doivent subir un certain nombre de modifications afin de les rendre bioactives et d'interagir efficacement avec les cellules qui la colonisent. Les principales modifications susceptibles d'améliorer leur réponse biologique sont résumées dans la Figure 37.

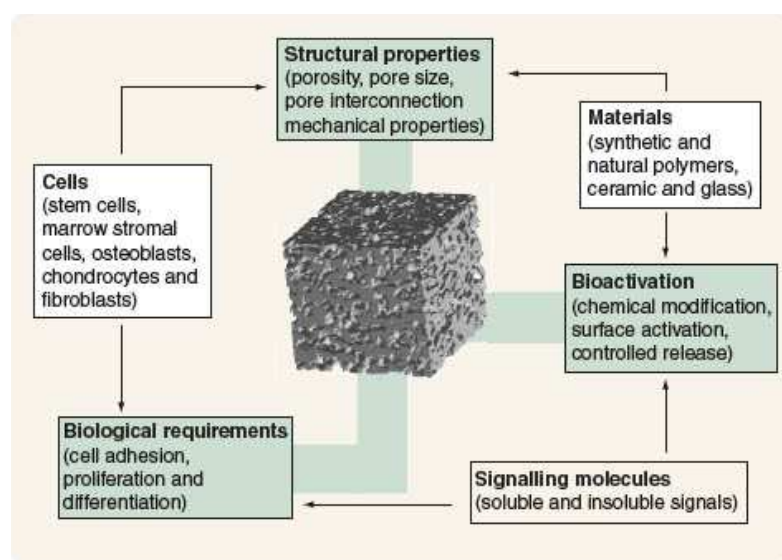


Figure 37. Les différentes modifications des matériaux afin de les rendre bioactifs [Guarino et al., 2007].

b) La composante cellulaire

Dans un contexte d'ingénierie tissulaire, les cellules utilisées peuvent être des cellules déjà matures ou des cellules souches d'origine adulte ou embryonnaire.

Les cellules ostéoblastiques différenciées, déjà matures, présentent un intérêt limité puisque la source principale est l'os spongieux. Ces cellules n'ont pas une grande capacité proliférative et se différencient rapidement au cours des différents passages.

C'est dans ce contexte d'ingénierie tissulaire que la recherche sur les cellules souches a pris un essor considérable. Les cellules souches se caractérisent par un potentiel prolifératif élevé, une capacité de s'auto-renouveler sans signe de sénescence et ne présentent pas de caractéristiques différenciées. Les cellules souches totipotentes sont capables de donner

naissance à n'importe quel type cellulaire des trois couches embryonnaires (endoderme, mésoderme, ectoderme).

Les cellules souches embryonnaires utilisées en recherche sont majoritairement pluripotentes, signifiant qu'elles peuvent donner naissance à plusieurs types cellulaires des trois couches embryonnaires [Zwaginga and Doevendans, 2003] et sont hautement prolifératives (Tableau 2). Cependant, dans un contexte de thérapie cellulaire guidée ou non par des biomatériaux, ces cellules souches présentent des risques non négligeables d'induction de tumeurs et ne peuvent être utilisées en système autologues. De plus, les lois éthiques limitent en France leurs utilisations, principalement au domaine cardiovasculaire.

Les cellules souches adultes ont une capacité à proliférer inférieure aux cellules souches embryonnaires et sont considérées comme multipotentes désignant des cellules capables de se différencier en plusieurs types cellulaires appartenant à la même couche embryonnaire (Tableau 2). Ces cellules sont déjà utilisées en clinique dans plusieurs applications dont le domaine ostéo-articulaire et présentent le principal avantage de pouvoir être utilisées en conditions autologues. A l'heure actuelle, la source principale des cellules souches adultes dans un but d'ingénierie du tissu osseux, est la moelle osseuse [Jiang et al., 2002; Kanczler et al., 2008] mais le tissu adipeux pourrait devenir la source privilégiée de ces cellules [Bunnell et al., 2008]. En effet, il a été établi récemment que de nombreux types cellulaires tels que les cellules endothéliales et les cellules osseuses peuvent être obtenues à partir de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux [Casteilla and Dani, 2006; Planat-Benard et al., 2004]. En outre, le prélèvement de tissu adipeux reste beaucoup moins invasif pour le patient que celui de la moelle osseuse.

Cellules souches embryonnaires

Pluripotentes (+)
Capacité proliférative élevée (+)

Non-autologues
Problèmes éthiques
Inducteur de tumeur

Cellules souches adultes

Multipotentes
Capacité proliférative limitée

Autologues (+)
Moins controversé (+)
Non-inducteur de tumeur (+)

Tableau 2. Avantages et inconvénients des cellules souches embryonnaires et adultes.

Enfin, si pendant de nombreuses années, la régénération osseuse guidée par un biomatériau proposait une association de ce matériau avec des cellules ostéoprogénitrices autologues, de plus en plus d'équipes de recherches s'intéressent à ce jour en l'association d'un biomatériau avec des cellules progénitrices endothéliales et ostéoblastiques pour assurer la reconstruction d'un tissu osseux vascularisé [Kaigler et al., 2006a; Kanczler and Oreffo, 2008; Unger et al., 2007; Wenger et al., 2004]. Il reste alors à définir le mode d'induction de leur différenciation, soit par contraintes biochimiques et l'ajout de facteurs inductibles (BMPs, VEGF...), soit par un environnement de contraintes dynamiques approprié.

C'est dans ce contexte que les bioréacteurs présentent à ce jour un intérêt considérable. Ils permettent la culture des cellules en 3 dimensions qui se rapproche au plus près des conditions *in vivo*, une prolifération rapide des cellules due à la perfusion des biomatériaux et de façon plus générale un engagement des cellules souches vers un lignage spécifique.

c) Les facteurs bioactifs

Afin d'améliorer la bioactivité des matériaux, de les rendre plus « attractifs » par les cellules du tissu hôte, ou encore pour stimuler une fonction spécifique des cellules le colonisant, des stratégies de fonctionnalisation des matériaux sont de plus en plus utilisées à l'aide de différents facteurs bioactifs. Parmi ces facteurs, des molécules bioactives telles que la BMP-2 ou le VEGF peuvent être adsorbées aux biomatériaux et libérées après leur implantation [Kaigler et al., 2006b; Simmons et al., 2004]. Leurs fonctions seront alors de stimuler la différenciation des cellules ostéogéniques ou encore l'activité angiogène des progéniteurs endothéliaux. Un certain nombre de travaux ont été menés en implantant *in vivo* des biomatériaux fonctionnalisés tels que l'hydroxyapatite ou des hydrogels capables de libérer des facteurs angiogènes qu'ils contiennent et ainsi de réguler la réparation osseuse [Murphy et al., 2004; Schnettler et al., 2003]. D'autres études combinent les deux types de facteurs angiogènes et ostéoblastiques pour favoriser angiogenèse et ostéogenèse [Simmons et al., 2004].

Un autre type de fonctionnalisation concerne les peptides d'adhésion. L'adhésion des cellules à un biomatériau est une étape primordiale dans la création d'un tissu en 3 dimensions et peut jouer un rôle crucial dans la progression de la formation tissulaire. Des séquences peptidiques impliquées dans l'adhésion cellulaire peuvent donc être adsorbées ou greffées de manière covalente à un biomatériau telles que les séquences contenant des motifs peptidiques RGD (Arg-Gly-Asp) [Anselme, 2000; Porte-Durrieu et al., 2004] ou YIGSR (Tyr-Iso-Gly-Ser-Arg) plus spécifique de l'adhésion des cellules endothéliales [Jun and West, 2005]. De nombreux auteurs combinent plusieurs types de séquences pour multiplier, soit les types cellulaires recrutés, soit la force d'adhésion des cellules recrutées à cette matrice [Fittkau et al., 2005; Rezania and Healy, 1999; Weber et al., 2007].

d) La composante mécanique : intérêt des bioréacteurs

Comme cela a été précisé dans les paragraphes précédents, une des méthodes de plus en plus employée en ingénierie tissulaire est celle de la croissance *in vitro* de cellules dans une matrice ayant une composition et une géométrie spécifiques. Une des limites de cette culture *in vitro* est l'apport insuffisant en oxygène et en nutriments aux cellules au sein même de ces biomatériaux lorsque ces derniers sont micro- ou macroporeux. Par exemple, des sphères d'hydrogel d'un diamètre supérieur à 1 mm ne permettent pas une oxygénation totale des cellules qui sont situées au centre de ces microsphères et ces cellules deviennent rapidement nécrotiques [Sutherland et al., 1986; Volkmer et al., 2008]. De plus, les contraintes mécaniques, inexistantes dans un système *in vitro* statique, constituent un élément essentiel pour la croissance, l'activité et la différenciation cellulaire afin de se rapprocher au mieux des conditions *in situ*.

Le développement de bioréacteurs a permis de pallier ces insuffisances. Les bioréacteurs sont définis comme des dispositifs permettant le développement de processus biologiques et/ou biochimiques dans des conditions environnementales où le pH, la température, la pression et les apports en nutriments, sont extrêmement contrôlés et où les déchets et gaz carbonique sont évacués (Figure 38) [Martin et al., 2004]. Ils sont couramment utilisés dans les procédés industriels de fermentation, du traitement des eaux ou encore dans la production de produits pharmaceutiques ou de protéines recombinantes comme des anticorps, des facteurs de croissance, des antibiotiques ou des vaccins.

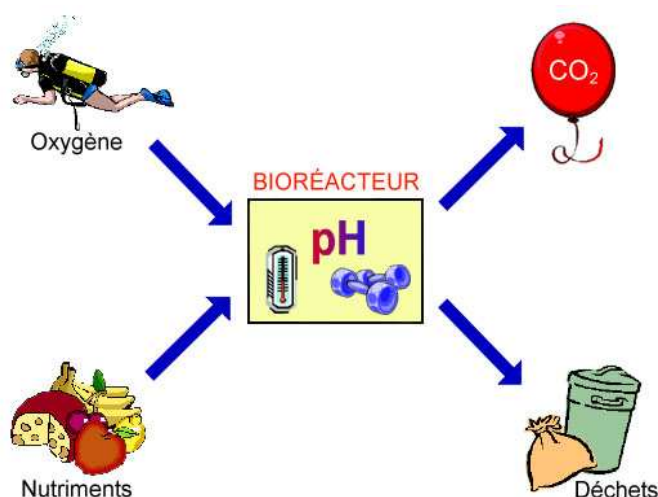


Figure 38. L'intérêt des bioréacteurs.

Plusieurs types de bioréacteurs ont été développés pour la reconstruction de tissus.

Le plus simple des bioréacteurs est le « spinner-flask » ou « flasque à remous » (a). Pendant, la phase d'adhésion des cellules, les mouvements des fluides permettent aux cellules d'aller se loger en périphérie mais aussi à l'intérieur du biomatériau. Il procure aussi un transfert de nutriments efficace pour le développement des tissus.

Les structures en 3D peuvent être également cultivées dans un « rotating-wall vessel » qui peut être traduit par « un vaisseau dont les parois tournent » où les contraintes dynamiques sont de faibles contraintes de cisaillement mais qui permettent un transfert en nutriments très efficace (b). Des cellules mésenchymateuses cultivées dans ce type de bioréacteur et sous l'influence de milieux spécifiques sont capables de se différencier en tissus cartilagineux et osseux [Marolt et al., 2006].

Pour la culture des cellules plus sensibles à l'apport en nutriments et oxygène comme les hépatocytes, le milieu de culture peut être perfusé à travers des fibres semi-perméables (c). La perfusion peut aussi s'effectuer directement par les pores des fibres, ce qui va procurer un apport en nutriments et oxygène de la périphérie à l'intérieur du matériau (d). Il a d'ailleurs été démontré que cette technique favorise le dépôt de matrice minéralisée par des cellules issues de moelle osseuse [Bancroft et al., 2002; Bjerre et al., 2008]. Dans le même sens, le travail de Scherberich a montré que des matériaux colonisés par des cellules souches issues de tissu adipeux peuvent favoriser la formation de tissu osseux vascularisé lorsqu'il est perfusé pendant 5 jours puis implanté *in vivo* en sous-cutané [Scherberich et al., 2007].

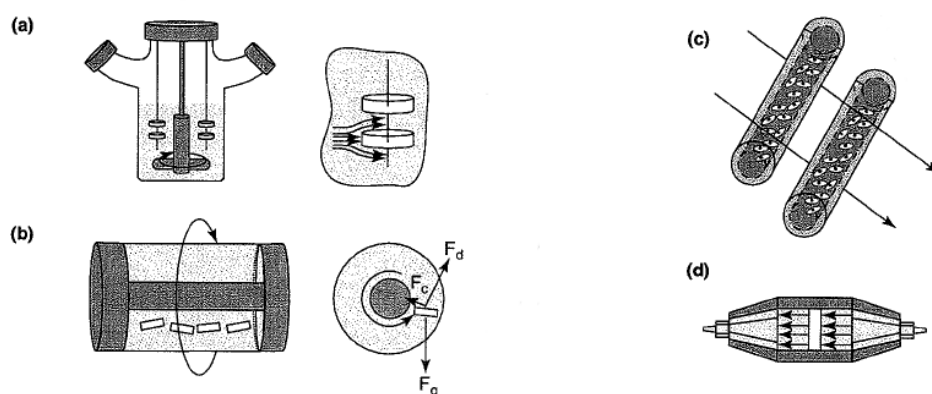


Figure 39. Les différents types de bioréacteurs décrits par Martin et al., 2004.

En conclusion, le développement des bioréacteurs a permis à l'ingénierie tissulaire une avancée importante dans le domaine de la régénération ostéo-articulaire, car leur utilisation a pu permettre de générer ces tissus en 3 dimensions.

La Figure 40 résume les principales étapes de l'ingénierie tissulaire « de la boîte de culture jusqu'au lit du patient ». Les cellules peuvent être prélevées chez le patient, multipliées et/ou différenciées en culture *in vitro* puis associées à une matrice ainsi qu'à des molécules actives. Cette structure est alors cultivée sous contraintes dynamiques et/ou biochimiques pour permettre la synthèse d'une matrice extracellulaire par les cellules elles-mêmes. Enfin, ce produit d'ingénierie tissulaire est réimplanté chez le patient.

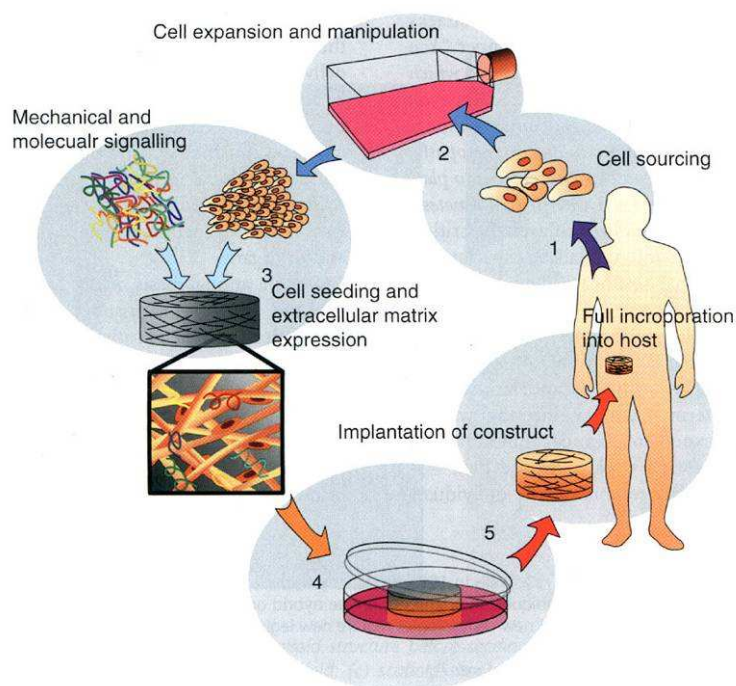


Figure 40. Les étapes de l'ingénierie tissulaire [Van Blitterswijk, 2008].

C. Applications cliniques dans le domaine de la reconstruction osseuse

En ce qui concerne les applications cliniques rapportées à ce jour, le remplacement des pertes de tissu osseux par du tissu spongieux autologue (autogreffe) reste la technique de référence. L'inconvénient majeur de ce type de remplacement est le volume disponible limité du matériel osseux, notamment dans les cas où les patients sont des enfants, ou atteints d'ostéoporose ou encore lors de pertes massives trop importantes liées à des métastases osseuses. De plus, les prélèvements de ces tissus sont sources de douleur, hématomes et d'infections au niveau du site donneur [Bajada et al., 2008].

Une alternative à ces autogreffes est la mise en place d'allogreffes grâce à l'existence de banques d'os. L'implantation de tissu osseux provenant d'un individu donneur (allogreffe) est utilisée mais ce tissu doit être traité avant toute implantation afin de minimiser les risques potentiels de transmission de maladies. Les méthodes de conservation sont soit la cryopréservation dans l'azote liquide à -196°C, soit la lyophilisation. Cette dernière technique permet la déshydratation sans dénaturation de la matière (par action conjuguée du vide et du froid) et une conservation à température ambiante. Cet os présente une bonne résistance mécanique en compression mais l'os congelé présente une résistance mécanique qui est plus proche de l'os normal. Une fois réimplanté, l'os lyophilisé se réhydrate lentement en quelques jours et ses valeurs mécaniques se rapprochent ainsi de celles de l'os normal en restant toutefois inférieures à l'os congelé [Enneking and Campanacci, 2001].

L'implantation de matériaux seuls ou chargés en facteurs de croissance (principalement des BMPs) ont déjà fait l'objet de quelques études cliniques. C'est le cas en particulier des matrices de collagène de type I permettant la libération de facteurs de croissance comme les BMPs [Friedlaender et al., 2001; Geesink et al., 1999; Schmidmaier et al., 2007].

Mais il existe des limites à ce type de matériaux ostéoinducteurs. En effet, la concentration de la BMP dans l'os est de l'ordre du nanogramme par ml. Elle est proposée en clinique en dose de milligramme par ml soit une augmentation de la concentration physiologique d'au moins un facteur 6 et avec une cinétique de délivrance difficilement contrôlable et des risques non négligeables de transformation cellulaire et d'induction d'ostéo-sarcomes. De plus, la réparation d'une fracture met en jeu une cascade de facteurs (facteurs de croissance, cytokines...) et la BMP ne paraît plus suffisante pour stimuler à la fois la bio-intégration de biomatériaux, la formation et la vascularisation osseuse.

Une autre approche utilisée par les chirurgiens est l'imprégnation des matériaux dans de la moelle osseuse autologue avant l'implantation. Le matériau sera ainsi chargé en facteurs de croissance mais aussi en cellules autologues ostéoprogénitrices que contient la moelle. Une alternative à cette méthode consiste en l'association des biomatériaux avec des cellules sélectionnées mais cette technique suppose un équipement en culture cellulaire à proximité du bloc opératoire et une réglementation qui reste encore complexe [Bolland et al., 2007].

Néanmoins, quelques exemples à ce jour rapportent l'utilisation des cellules souches issues de la moelle osseuse pour réparer un défaut osseux. Face à la perte d'une phalange d'un doigt d'un patient, Vacanti et al. ont développé un substitut composé de corail et de cellules mésenchymateuses prélevées dans le périoste [Vacanti et al., 2001]. Cependant, vingt-huit mois après l'implantation de ce biomatériau, le patient avait retrouvé seulement 25% de la force initiale développée par son pouce.

D'autres études ont utilisé de l'hydroxyapatite pour le comblement d'un segment osseux de 4 à 7 cm. Quarto et al. ont associé des cellules souches à l'hydroxyapatite et ont mis en évidence une bonne intégration du biomatériau mais une formation osseuse limitée aux contours externes de l'implant, probablement là où les cellules étaient toujours viables [Quarto et al., 2001].

Marcacci et al. ont, quant à eux, prolongé le suivi de l'étude jusqu'à 7 ans après l'implantation de tels substituts. Dans cette dernière étude, les cellules souches ont été associées à de l'hydroxyapatite et du fibrinogène puis implantées au niveau du défaut osseux [Marcacci et al., 2007]. Les résultats ont montré une bonne intégration du biomatériau dans le tissu hôte mais sans dégradation du support. Dans le cas de comblement de pertes osseuses après exérèse d'une tumeur, Morishita et al. ont également utilisé des cellules souches associées à de l'hydroxyapatite [Morishita et al., 2006].

Une autre approche, principalement utilisée dans le domaine de l'odontologie, consiste à associer les cellules souches mésenchymateuses à une matrice de plasma riche en plaquettes (platelet-rich-plasma, PRP). Les auteurs ont remarqué une bonne formation osseuse [Hibi et al., 2006a; Hibi et al., 2006b; Kitoh et al., 2004]. L'intérêt de l'utilisation de ce type d'association est sa capacité à être injecté et évite ainsi toute chirurgie lourde pour le patient [Plachokova et al., 2008].

Dans ce même domaine odontologique et dans le cas de réparation mandibulaire, une construction associant du titane, des cellules mésenchymateuses ainsi qu'un facteur de croissance de type BMP (BMP7) a été élaborée *in vivo* chez le patient, implantée dans un muscle situé au niveau du dos, puis ré-implantée dans le site lésé. La structure a été bien intégrée et une formation osseuse a été observée [Warnke et al., 2004]. Cette technique a pour but de créer une vascularisation du substitut osseux avant son implantation au sein du site osseux défaillant [Kneser et al., 2006].

Ces différentes stratégies ont permis d'améliorer la cinétique de formation osseuse et les propriétés d'ostéoinduction et d'ostéoconduction de ces produits d'ingénierie tissulaire. Les équipes de recherche s'intéressent maintenant à améliorer la néo-vascularisation des implants.

D'après nos connaissances, l'utilisation clinique de matériaux chargés en facteurs angiogènes pouvant promouvoir la vascularisation de l'implant n'a pas encore été rapportée. L'association de substituts avec plusieurs types cellulaires, tels que des cellules ostéoformatrices et endothéliales, reste également encore à l'état expérimental.

OBJECTIFS

Les données de la littérature concernant l'ingénierie du tissu osseux démontrent que les échecs rencontrés dans le domaine de la substitution osseuse guidée par les biomatériaux sont en partie liés à leur faible capacité de colonisation et à un défaut de vascularisation de ces implants. Les techniques d'implantation de cellules progénitrices dans un biomatériau de substitution osseuse ont ouvert une voie de développement de thérapeutiques substitutives à la pratique de l'allogreffe et de l'hétérogreffe dont les limitations ont été présentées.

Cependant, on ne peut envisager un tel mécanisme de réparation tissulaire sans une meilleure connaissance du rôle du microenvironnement cellulaire, biochimique ou dynamique dans lesquels ces matériaux cellularisés seront placés. Ceci implique de mieux comprendre les différents paramètres qui contrôlent l'activité des cellules ostéoprogénitrices: fonction du microenvironnement sollicité dans la régénération osseuse, rôle de l'angiogenèse, importance de la structure tridimensionnelle comme véhicule des cellules « réparatrices », rôle des contraintes dynamiques...

Deux des principaux thèmes de recherche développés au sein de l'unité U577 sont :

- la mise au point de modèles de culture de cellules humaines progénitrices endothéliales et ostéoblastiques, issues du sang périphérique et de la moelle osseuse respectivement. Ces modèles, caractérisés sur le plan phénotypique, sont utilisés pour élaborer *in vitro* des matériaux hybrides et étudier la réponse de ces cellules vis-à-vis de supports matriciels, en conditions statiques et dynamiques.

- l'étude de la communication ostéo-endothéliale à l'aide de co-culture de cellules souches issues de la moelle osseuse (HBMSCs) orientées vers le lignage ostéoblastique et de cellules endothéliales humaines issues du cordon ombilical (HUVECs).

Dans ce dernier cas, les principaux résultats obtenus par le laboratoire ont montré que les HUVECs étaient capables de réguler la différenciation ostéoblastique des HBMSCs par l'établissement de jonctions communicantes et l'activité des connexines 43 [Guillotin et al., 2008; Guillotin et al., 2004; Villars et al., 2000; Villars et al., 2002].

Par contre, les modes de communication faisant intervenir une activité autocrine / paracrine de facteurs solubles produits par l'un ou l'autre des types cellulaires ont été peu abordés. Il en est de même pour l'étude du phénotype endothélial sous l'influence des cellules ostéoblastiques.

De plus, cette étude de la communication ostéo-endothéliale a été réalisée dans un système 2D de culture. En aucun cas les modes de communication entre ces deux types cellulaires en co-culture dans une matrice 3D n'ont été évalués, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* dans un modèle expérimental de reconstruction osseuse.

Enfin, selon les principes de l'ingénierie tissulaire, les matériaux hybrides ainsi formés doivent être capables de subir et de s'adapter aux contraintes dynamiques qui résident dans le tissu osseux. Il est donc nécessaire avant toute élaboration de ces produits d'ingénierie tissulaire d'utiliser des cellules à même de répondre aux forces locales s'exprimant au sein du tissu osseux, dont les contraintes de cisaillement.

Face à cette problématique et compte tenu des précédentes données du laboratoire, l'objectif et les lignes directrices de la thèse ont été :

- de compléter les données phénotypiques des cellules endothéliales et ostéoblastiques utilisées dans ce travail et plus particulièrement, d'étudier la mécanotransduction des cellules ostéoprogénitrices soumises à des contraintes de cisaillement à l'aide d'une chambre bidimensionnelle de flux (premier article). Des travaux similaires ont été effectués durant mon stage de Master Recherche 2^{ème} année pour étudier la réponse des cellules endothéliales soumises aux contraintes de cisaillement [Daculsi et al., 2008].

- d'identifier la fonction paracrine de facteurs libérés dans un modèle 2D de co-culture des HBMSCs et des HUVECs sur l'organisation des cellules et sur la fonction ostéoblastique. Nous nous sommes principalement intéressés au rôle du VEGF dans cette relation ostéo-endothéliale (deuxième article).

- d'identifier une structure tridimensionnelle, susceptible d'héberger ces deux composantes cellulaires, permettre une communication grâce aux facteurs angiogènes et ostéogènes produits par ces éléments cellulaires et promouvoir la synthèse *in vitro* d'une matrice minéralisée. Enfin, un modèle expérimental chez le petit animal nous a permis d'étudier la synthèse d'une matrice minéralisée guidée par cette structure 3D cellularisée par les deux types cellulaires. Dans ce contexte, le troisième article rapporte :

- l'étude *in vitro* de l'immobilisation des deux types cellulaires au sein de microsphères d'alginate, matériau biocompatible et naturellement résorbable,
- l'étude *in vivo* de ce système 3D après implantation de ces microsphères dans un modèle de lésion osseuse réalisée chez la souris *nude*.

Les principaux objectifs de la thèse peuvent être résumés dans le schéma ci-dessous (Figure 41).

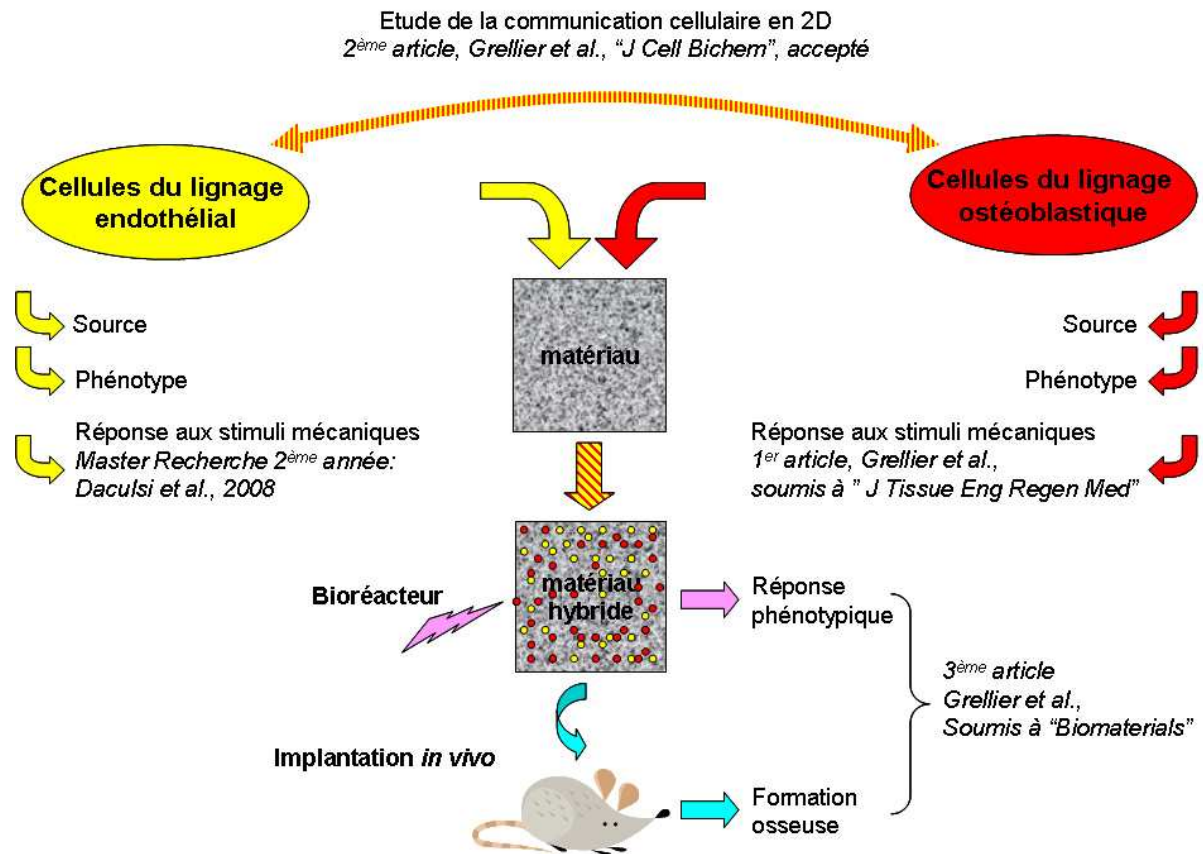


Figure 41. Schéma récapitulatif des objectifs de la thèse.

RESULTATS

I. Les modèles cellulaires sollicités dans la reconstruction d'un os vascularisé

A. Introduction

Dans un contexte d'ingénierie tissulaire, il est maintenant admis que la performance des biomatériaux de substitution osseuse peut être améliorée par leur association avec une composante biologique qu'elle soit de nature protéique ou cellulaire. Dans ce dernier cas, le choix du modèle cellulaire pour une application en médecine régénératrice doit reposer sur un certain nombre de critères en termes de source cellulaire, de propriétés d'adhésion au biomatériau, de prolifération et de compatibilité avec le tissu hôte. En outre, leur capacité de différenciation vers le lignage spécifique du tissu lésé doit être maîtrisée.

Ainsi, compte tenu du rôle de la vascularisation dans la néo-formation osseuse et de la volonté de développer des techniques d'ingénierie du tissu osseux vascularisé, il était nécessaire de:

- disposer des deux lignages cellulaires ostéoblastique et endothélial susceptibles de former une matrice osseuse minéralisée et vascularisée au sein d'un biomatériau,
- de définir la source biologique la plus pertinente de ces deux lignages,
- de maîtriser les mécanismes de leur différenciation et le maintien de leur phénotype, dans un environnement biochimique spécifique,
- de définir leur sensibilité à des contraintes mécaniques, sachant qu'*in vivo*, cette reconstruction tissulaire sera soumise à de multiples contraintes dynamiques (compression, étirement, cisaillement).

Dans ce premier travail, nous avons complété les données phénotypiques de ces deux lignages ostéoblastique et endothélial utilisés pendant mon travail de thèse.

1) Le modèle de cellules endothéliales

Plusieurs sources de cellules endothéliales peuvent être utilisées dans le domaine de la recherche. Afin de développer une stratégie d'ingénierie tissulaire, une source de cellules progénitrices capables de se différencier en cellules endothéliales est privilégiée. Les origines de telles cellules connues à ce jour sont le sang de cordon ombilical, la moelle osseuse, le sang périphérique et le tissu adipeux. Néanmoins, il est encore difficile de sélectionner et de bien maîtriser la différenciation des progéniteurs endothéliaux. La sélection et la différenciation des progéniteurs endothéliaux à partir de sang périphérique est en cours d'étude dans notre équipe [Thebaud et al., 2008]. Des cellules endothéliales matures issues de veines ou d'artères permettent de pallier ce manque provisoire et sont couramment utilisées dans les travaux de recherche de notre laboratoire.

Dans ce travail, les cellules endothéliales ont été isolées à partir de la veine de cordons ombilicaux prélevés dans les 24 heures qui suivent la délivrance et sont appelées HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells). Les cellules obtenues par digestion enzymatique sont cultivées dans un milieu IMDM supplémenté en 20% de sérum de veau fœtal (SVF), en

ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement) et héparine selon le protocole décrit par Bordenave et al. [Bordenave et al., 1993; Bordenave et al., 1992] avec quelques modifications (voir annexe 1). Les cellules adhèrent au support de culture dès les premières heures de contact et atteignent le stade de la monocouche confluite après 3 à 5 jours de culture. Cette monocouche est composée de cellules pavimenteuses jointives (Figure 42) qui semblent conserver *in vitro* les caractéristiques qu'elles possèdent *in vivo*, en particulier l'inhibition de contact, empêchant la formation de multicouches lorsque le support de culture est complètement colonisé.

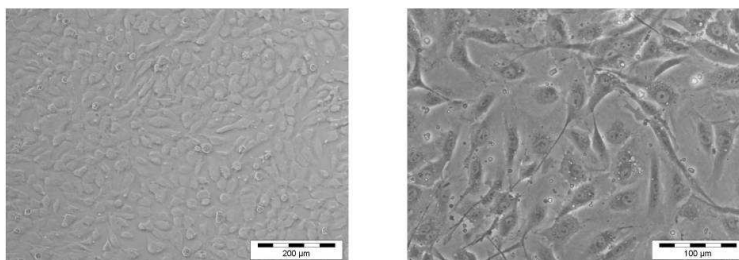


Figure 42. Morphologie pavimenteuse des cellules endothéliales.

L'endothélium vasculaire occupe une position privilégiée dans la régulation de la balance hémostatique, puisque la cellule endothéliale présente à la fois des propriétés de thromborésistance, mais peut également acquérir un phénotype thrombogène. Parmi les marqueurs spécifiques des cellules endothéliales, le von Willebrand (vWF) est une protéine contenue dans les corps de Weibel Pallade et sécrétée lors d'une stimulation de la cascade de coagulation (Figure 43 A et B). De plus, les récepteurs au VEGF sont exprimés par les HUVECs (Flt-1 et KDR) ainsi que le CD31 (ou PECAM) et la VE-Cadhérine, molécules impliquées dans les jonctions adhérentes (Figure 43 C, D et E). D'un point de vue fonctionnel, les HUVECs sont capables de créer des réseaux tubulaires lorsque ces cellules sont cultivées en 3D sur du Matrigel (Figure 43 F).

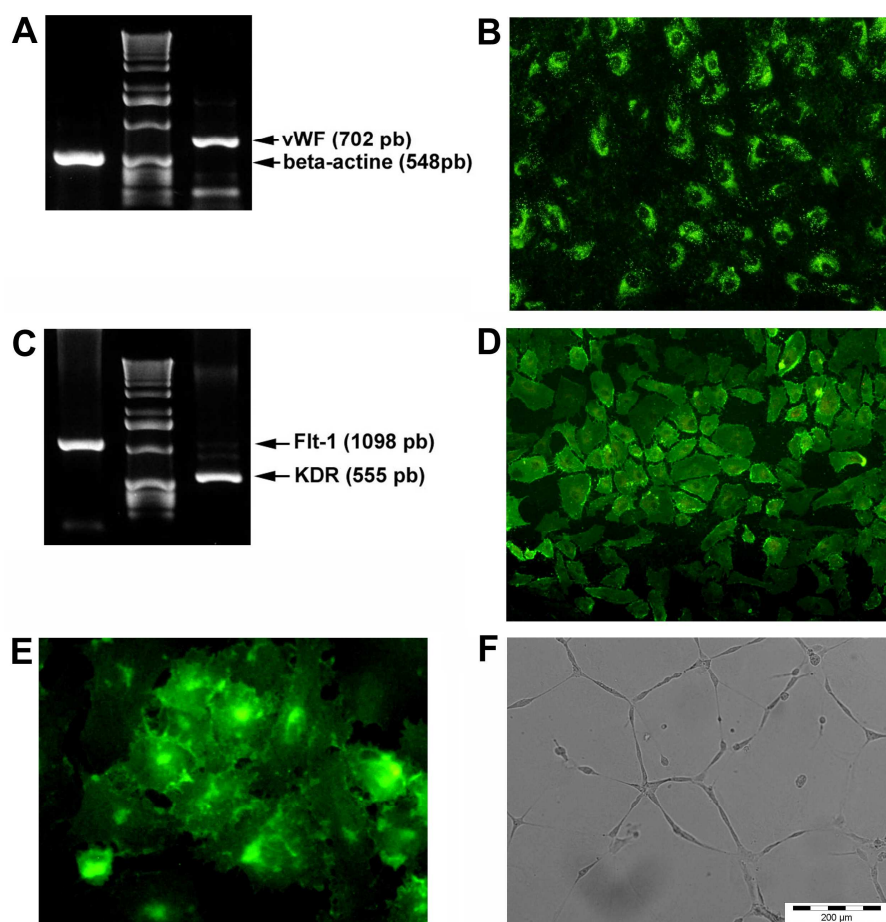


Figure 43. Phénotype endothélial, exprimé par les HUVECs.

A : vWF analysé par RT-PCR. B : Détection par immunofluorescence du vWF, localisé dans les corps de Weibel Pallade (grossissement x200). C : Analyse en RT-PCR des récepteurs au VEGF Flt-1 et KDR. D : Détection du CD31 par immunofluorescence (grossissement x100). E : VE-Cadhérine par immunofluorescence (grossissement x400). F : Structure en capillaires formée par les HUVECs cultivées sur du Matrigel. Les méthodes utilisées pour la caractérisation de ces cellules sont précisées dans l'annexe 1.

Les cellules endothéliales sont également capables répondre à la stimulation par une cytokine pro-inflammatoire. Après stimulation à l'IL-1 (5ng/mL pendant 30min à 4h), la phosphorylation des MAPK ERK1/2, p38 et JNK est stimulée et la translocation au noyau de NF- κ B activée. De plus, l'activité pro-coagulante en partie due à la production de facteur tissulaire (FT) est stimulée après une exposition des cellules endothéliales à l'IL-1. Ces résultats sont présentés en annexe 2 [Daculsi et al., 2007].

D'autre part, l'endothélium est en permanence soumis à des contraintes de cisaillement induites par le flux sanguin. La mécanotransduction des cellules endothéliales a été étudiée grâce à un système de chambre à flux laminaire (Figure 44). Daculsi et al. ont montré que la voie des MAPK ERK1/2 et p38 est activée après application de contraintes mécaniques de 12 dynes/cm² pendant des temps de 2 à 30 minutes (voir annexe 3) [Daculsi et al., 2008].

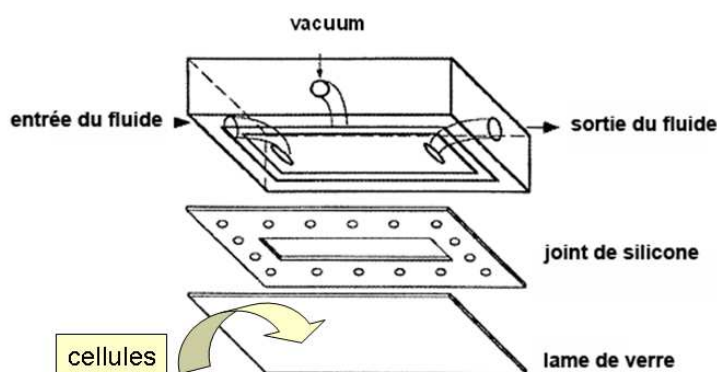


Figure 44. Principe de chambre à flux laminaire.

Ces deux derniers travaux ont été en partie effectués durant mon stage de Master Recherche 2^{ème} année, réalisé au sein de l'unité INSERM U577, et m'ont permis d'être co-signataires de deux articles publiés dans « *Endothelium* » en 2007 (annexe 2) et dans « *Journal of Biomechanics* » en 2008 (annexe 3).

2) Le modèle de cellules ostéoblastiques

En ce qui concerne le lignage ostéoblastique, si les cultures de lignées ostéoblastiques transformées d'origine animale ou humaine (SaOs2, MG63, ROS, MC3T3...) présentent un grand nombre d'avantages (prolifération rapide, possibilité d'un nombre de générations très élevé, reproductibilité de la réponse biologique), ces lignées cellulaires ne peuvent être utilisées qu'à des fins de recherche fondamentale. En outre, le comportement de ces cellules transformées en termes d'adhésion, de prolifération ou de différenciation diffère de celui observé avec des cultures primaires de cellules humaines différenciées.

Il reste à définir les sources de cellules humaines capables de se différencier en cellules ostéoblastiques. L'os trabéculaire peut être une source importante de cellules ostéoblastiques mais ces cellules matures se dédifférencient rapidement au cours des passages et leur capacité proliférative est limitée.

Dans ce travail, nous avons utilisé des cellules ostéoprogénitrices isolées à partir des cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine (appelées HOPs pour Human OsteoProgenitors). Les conditions de cultures ont été modifiées [Villars et al., 2000] et l'induction ostéoblastique de ces cellules mésenchymateuses se fait dans un milieu IMDM, supplémenté en 10 % de SVF et de dexaméthasone à 10^{-8} M ajouté pendant les deux premières semaines de culture (voir annexe 1).

La morphologie des cellules est de type fibroblastique, ce sont des cellules très étalées, allongées avec de longs prolongements cytoplasmiques.

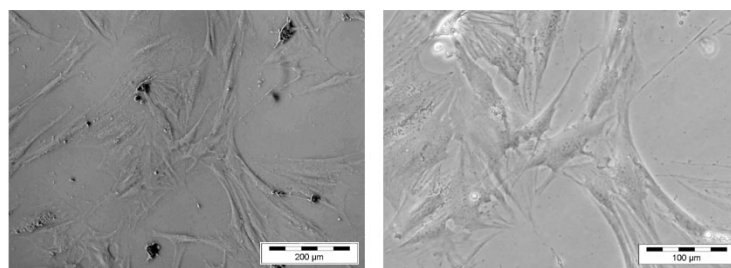


Figure 45. Morphologie « fibroblastique » des cellules ostéoprogénitrices (HOPs)

Les cellules expriment les marqueurs précoces du phénotype ostéoblastique tels que le Cbfa1/Runx2, la PAL et le collagène de type I (Figure 46 A-C). Ces cellules ostéoprogénitrices humaines sont capables de former des jonctions communicantes de type gap, principalement constituées de connexines 43 (Figure 46 D) [Villars et al., 2002].

De plus, ces cellules expriment le récepteur spécifique VDR (Vitamin D Receptor) et sont capables de répondre à une stimulation par le métabolite actif de la vitamine D (le $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) par une activation de l'expression de l'ostéocalcine [Fauchoux et al., 1998]. Enfin, en présence de β -glycérophosphate, d'acide ascorbique ou de vitamine D, ces cellules forment des nodules de minéralisation visibles par une coloration au Von Kossa (Figure 46 E) [Fauchoux et al., 1998].

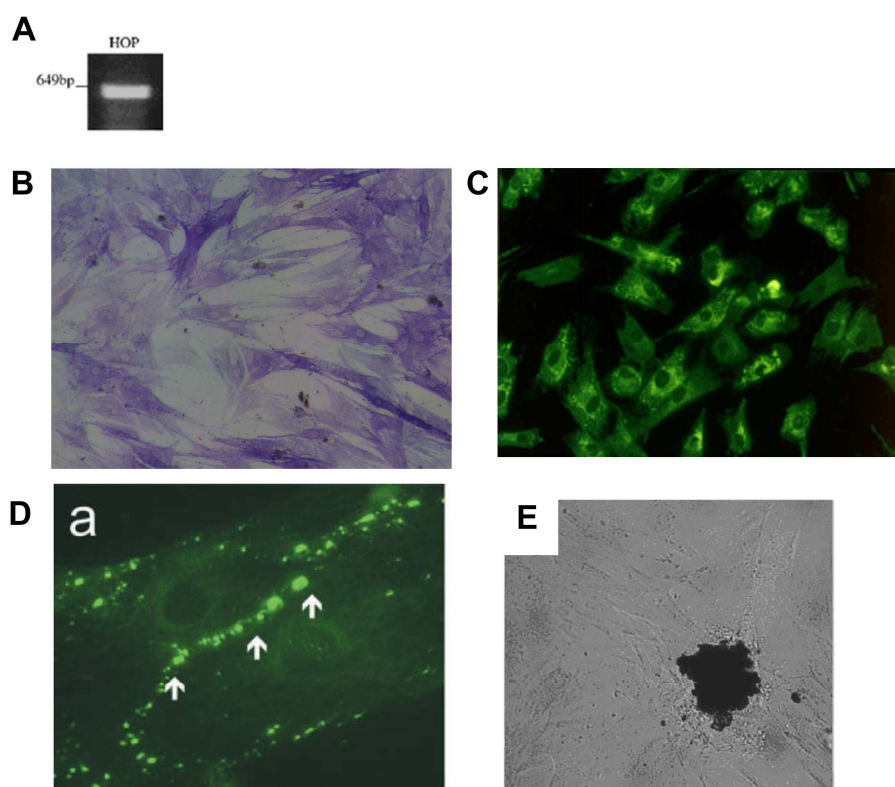


Figure 46. Caractéristiques phénotypiques des HOPs.

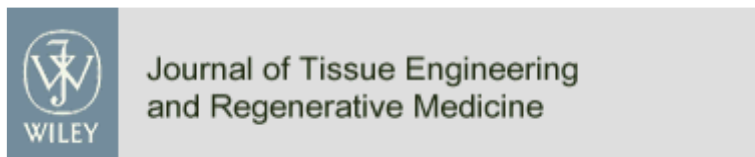
A : Cbfa1-Runx2 analysé par RT-PCR. B : Activité de la PAL révélée par cytochimie (grossissement x100). C : Détection du collagène de type I par immunofluorescence (grossissement x200). D : Localisation de la Connexine 43 par immunofluorescence (grossissement x200) E : Nodule de minéralisation après stimulation des cellules par le composé actif de la vitamine D (grossissement x100). Ces données sont obtenues d'après les publication de Fauchoux et al, 1998 ; Villars et al, 2002 ; Guillotin et al., 2008.

Ainsi, les travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont permis de caractériser parfaitement le phénotype ostéoblastique de ces cellules HOPs. Néanmoins, dans un contexte d'ingénierie tissulaire, il nous est apparu intéressant de poursuivre la caractérisation de ces cellules par une étude de leur réponse à un stress mécanique, dès lors que ces cellules seront soumises à des contraintes mécaniques de différentes natures une fois implantées *in vivo* dans un biomatériau. Parmi ces contraintes, les travaux de la littérature ont particulièrement montré l'incidence des contraintes de cisaillement sur le phénotype ostéoblastique mais principalement sur les ostéocytes.

Le but de ce premier article a été d'étudier la réponse des cellules ostéoprogénitrices humaines à des contraintes de cisaillement, dans le même système de chambre à flux laminaire à 12 dynes/cm² que celui utilisé pour les cellules endothéliales [Daculsi et al., 2008]. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés :

- à la régulation de l'expression de marqueurs ostéoblastiques (PAL et collagène de type I)
- aux voies de signalisation activées par ces contraintes mécaniques, principalement la voie des MAPK p38 et ERK1/2
- à la régulation de l'expression des connexines 43 sachant que ces dernières peuvent jouer un rôle dans la transduction de signaux en réponse à des contraintes mécaniques.

B. Article



Responsiveness of Human Bone Marrow Stromal Cells to Shear Stress

M. Grellier, R. Bareille, C. Bourget, J. Amédée

INSERM, U577, Bordeaux and Université Victor Segalen Bordeaux 2, UMR-S577,
Bordeaux, F-33076, France

Soumis

Abstract

Background/Aim: We examined the hypothesis that human mesenchymal stem cells detect physiological mechanical signals. **Methods:** Human bone marrow stromal cells were exposed to fluid shear stress of 12 dynes/cm² and analyzed for their ability to express osteoblast-specific markers and associated signaling pathways. **Results:** Human stromal cells showed a significant increase in alkaline phosphatase (ALP) gene expression and a marked decrease in type I collagen, while no effect on Cbfa1/Runx2 was detected. This regulation is related to p38 and ERK1/2 activation, although the use of specific inhibitors to these two MAP kinases suggests that ALP mRNA induction is especially dependent on p38 activity, while type I collagen down-regulation is ERK1/2-dependent. Interestingly, the expression of connexin43, which is involved in cell-to-cell communication of osteoblastic cells through gap junction formation, and its distribution through the cells, were modified by fluid flow. **Conclusion:** Human bone marrow stromal cells are sensitive to biomechanical signals. The responsiveness of these human mesenchymal stem cells is therefore essential for the overall aim of bone tissue engineering using stem cells as reparative cells within a bioactive material.

Keywords: Human Bone Marrow Stromal Cells, Shear Stress, Osteoblasts, p38, ERK1/2, Connexin43

Running title: Mechanosensitivity of human osteoprogenitors

Introduction

Maintenance of appropriate bone mass requires the coordination of bone resorption by osteoclasts and bone formation by osteoblasts, and it is well known that mechanical stimuli regulate this cell coupling. More and more data suggest that not only osteocytes but also osteoblasts and osteoprogenitors are responsible for perceiving and responding to mechanical strain including compression, stretching and shear stress [Bonewald, 2007; Burger and Klein-Nulend, 1999; Robling et al., 2006].

Since bone is a porous material, the deformation of bone tissue during physiological levels of mechanical load induces a cyclic movement of interstitial fluid flow (FF), which predicted fluid shear rates calculated as being between 8 and 30 dynes/cm² [Weinbaum et al., 1994]. Accumulative evidence suggests that osteocytes are the mechanosensors within bone and that they elicit different biomechanical responses [Ponik and Pavalko, 2002] such as calcium-induced release of soluble factors (including nitric oxide [Batra et al., 2005] and PGE2 [Cherian et al., 2003; McGarry et al., 2005]), cytoskeleton re-organization [Myers et al., 2007], activation of kinase cascades including Mitogen-Activated Protein kinases (MAPK) and PKC pathways [Fan et al., 2006; Riddle et al., 2006], and regulation of bone-specific marker expression including Cbfa1/Runx2 [Mehrotra et al., 2006] or osteopontin [Ponik and Pavalko, 2002]. In addition, emerging studies suggest that FF could result in regulation of cell-to-cell contact and that gap junctional intercellular communication (GJC) contributes to mechanotransduction in osteocytes [Alford et al., 2003; Cherian et al., 2003; Taylor et al., 2007]. Taylor et al. [Taylor et al., 2007] demonstrated that FF increased gap junction expression through Connexin 43 (Cx43) up-regulation in an osteocyte cell line, although Thi et al. [Thi et al., 2003] demonstrated the opposite. Because cells residing in the bone marrow are closely associated with trabecular bone, bone marrow stromal cells could also be exposed

to FF. Although they play a key role in natural bone regeneration as well as in bone tissue engineering when associated to a scaffold [Tanaka et al., 2005], little is known about the mechanosensitivity of these bone marrow-derived osteoprogenitors [Li et al., 2004; Riddle et al., 2006; Simmons et al., 2003]. Simmons et al. [Simmons et al., 2003] demonstrated that human mesenchymal stem cells are able to respond to a cyclic strain by increasing the matrix mineralization or by activating cell proliferation. However, the cellular and molecular mechanisms by which stem cells respond is not well known, emphasizing the need for additional knowledge on this issue.

Here we developed a parallel flow chamber to investigate the effect of a laminar shear stress on the differentiation of human bone marrow stromal cells (HBMSC). We examined the hypothesis that these HBMSC detect physiological mechanical signals and regulate their osteoblastic function through MAPK activation. HBMSC exposed to a fluid shear stress of 12 dynes/cm² showed a rapid increase in osteoblastic activity as measured by alkaline phosphatase (ALP) gene expression but a decrease in type I collagen gene expression. These effects were dependent on p38 and ERK 1/2 activation. Interestingly, Cx43 mRNA level, which is involved in cell-to-cell communication in osteoblastic cell line through gap junction formation, was also increased by fluid shear stress. Western blot quantification suggested that there was a slight increase at the protein level and no significant effect on Cx43 phosphorylation. However, Cx43 was localized both in membrane and cytoplasm in stressed cells compared to unstressed cells, where Cx43 was mainly distributed in the membrane.

Materials and Methods

Human Bone Marrow Stromal Cells (HBMSC) Culture

After informed consent was obtained, human bone marrow was obtained by aspiration from the femoral diaphysis or iliac bone from patients undergoing hip prosthesis surgery after trauma. Cells were separated into a single suspension by sequential passage through syringes fitted with 16-, 18-, and 21-gauge needles. The cells were then counted and plated at 10^5 cells/cm² in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco) supplemented with 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS, PAA Laboratories), and incubated in a humidified atmosphere containing 5% (v/v) CO₂ at 37 °C. Dexamethasone at 10^{-8} M was added to the culture medium for the first two weeks of culture to induce osteoblastic differentiation of adherent cells [Villars et al., 2000]. They express Cbfa1/Runx2, ALP and type I collagen but do not express osteocalcin, which is a late osteoblastic marker.

Quantitative Real Time PCR (Q-PCR)

Total RNA was extracted using the RNeasy™ Total RNA kit (QIAGEN) and 1 µg was used as template for single-strand cDNA synthesis with the Superscript pre-amplification system (Gibco) containing 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml BSA, 10 mM DTT, 0.5 mM of each dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.5 µg oligo(dT)₁₂₋₁₈ and 50 U of reverse transcriptase. After incubation at 42°C for 50 minutes, the reaction was stopped at 70°C for 15 minutes and samples were kept on ice. Five microlitres of cDNA diluted 1/80 were loaded in a 96-well plate. 2X iQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad) was added to the final concentration of 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 0.2 mM of each dNTP, 25 units / mL iTaq™ DNA polymerase, 3 mM MgCl₂, SYBR™ Green I, 10 nM fluorescein, and stabilized in sterile distilled water. Primers were used at the final concentration of 200 nM

(Table I). Data were analyzed with the iCycler IQ™ software, and compared by the $\Delta\Delta C_t$ method. Each PCR was performed in triplicate for PCR yield validation.

Laminar Shear Stress Experiments

We used a parallel-plate culture flow chamber derived from that of Frangos et al. [Frangos et al., 1988] and adapted as previously described by Daculsi et al. [Daculsi et al., 2008]. A glass slide was seeded with cells ($50,000 \text{ cells/cm}^2$) that formed a confluent monolayer. Then, the slide formed the top of the flow chamber which was created by sandwiching a silicone gasket between the glass slide and an acrylic plate (Figure 1). Shear stress experiments were carried out at 37°C and the culture medium was buffered with HEPES (pH 7.4). Assuming Newtonian fluid behavior, the laminar wall shear stress applied to the cells (12 dynes/cm^2) was calculated with the Poiseuille law equation detailed in Daculsi et al. [Daculsi et al., 2008]. HBMSC were subjected to the laminar FF of 12 dynes/cm^2 for 30 and 90 min and control cells were placed in static conditions for the same period. Cell viability before and after shear stress application was checked with the Live/Dead viability/cytotoxicity kit, according to the manufacturer's protocol (Molecular Probes).

Immunoblotting Procedure

Shear-stressed and static cell cultures were harvested by treatment with trypsin-EDTA containing phosphatase inhibitors (10 mM NaF and 2mM sodium orthovanadate). Thereafter, cells were washed in cold-PBS with phosphatase inhibitors described above and protease inhibitors (10 $\mu\text{g/mL}$ leupeptin, 10 $\mu\text{g/mL}$ aprotinin and 1 mM phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF)). Cells were lysed in buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.7, 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% NP-40, 5 mM β -mercaptoethanol, phosphatase and proteases inhibitors at 4°C with gentle agitation. Lysates were clarified by centrifugation and the protein content of

cell lysates was measured using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce Biotechnologies). Equal quantities of protein (40µg/lane) were resolved by SDS-PAGE (10%) gel electrophoresis and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P, Millipore, USA). Non-specific sites were blocked for 1 hour in Tris-Buffered Saline-Tween (TBS-T: 20 mM, Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20) with 5% non-fat dry milk. Blots were incubated overnight at 4°C in TBS-T/5% non-fat dry milk containing: rabbit polyclonal anti-Extracellular signal-Related Kinase 1/2 (ERK1/2) from Upstate Biotechnology; anti-p38 and anti-phospho-p38 MAPK antibodies from Cells Signaling Technology; mouse monoclonal anti-phospho-ERK1/2 antibody from Cell Signaling Technology; mouse monoclonal antibody against connexin 43 from Chemicon, and anti- α -tubulin antibody from Sigma. Then, blots were washed in TBS-T and incubated in TBS-T/5% non-fat dry milk containing horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit IgG for 1 hour at room temperature. Finally, the blots were further washed in TBS-T and the immunoreactive bands were visualized using ECL-plus reagents (Amersham). The intensity of immunoreactive bands was analyzed using the National Institutes of Health 1.62 image analyzer software, which can express results as a ratio of specific phosphorylated proteins to unphosphorylated proteins.

Immunostaining of Connexin43

Cultures of HBMSCs were fixed in 4 % (w/v) paraformaldehyde for 20 min at 4°C and permeabilized in methanol 100% for 5 min at room temperature. Fixed cells were incubated for 30 min in PBS containing 1% (w/v) Bovine Serum Albumin (BSA), then for 1 hour at 37°C with primary antibody anti-Cx43 (Chemicon). Subsequently, cells were washed in PBS and incubated with Alexa-488-conjugated goat anti-mouse IgG (Molecular Probes) for 1 hour

at 37°C. Cultures were examined with a confocal microscope (Leica). Controls were performed without primary antibody.

PD98089 and SB203580 Treatments

Cells were deprived from FBS overnight then pretreated for 1 hour with 20 μ M of specific inhibitors to p38 MAPK (SB203580, Calbiochem) or to ERK1/2 (PD98089, Calbiochem) in IMDM – 0.1% DMSO, and finally exposed to shear stress performed in IMDM – 0.1% DMSO supplemented with the same concentration of inhibitors. Controls received an equal amount of DMSO. Three concentrations of inhibitors were tested first to control their inhibitory effect on HBMSC.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SD. The Mann-Whitney *U* test was used for intergroup comparisons for immunoblots. The ANOVA test was used for Q-PCR comparison of relative quantities and for inhibition experiments. A *p* value of ≤ 0.05 (*) and of ≤ 0.01 (**) was considered to be statistically significant.

Results

Fluid Shear Stress-regulated Osteoblastic Phenotype of HBMSCs

HBMSC were subjected to the laminar FF of 12 dynes/cm² for 30 and 90 min and control cells were placed in static conditions for the same period. When gene expression was calculated relatively to the static controls and to a ribosomal ubiquitary gene expression (P0), we noticed a 2-fold increase in ALP mRNA level after 30 min of shear stress (Figure 2). The increase was reduced 50% after 90 min of shear stress. For the same treatment, Cbfa1/Runx2

gene expression was unaffected by FF, whatever the duration of shear stress. On the other hand, type I collagen mRNA level was decreased after 90 min of shear stress.

Fluid Flow and Connexin43 Expression

As previously demonstrated, HBMSCs induced towards the osteoblastic lineage express large amounts of Cx43 [Guillotin et al., 2004; Villars et al., 2002], the component of gap junctions. Because FF shear stress increased cell-to-cell communication in osteocyte cell lines, it would be expected that the expression level of the Cx43 would be regulated. Therefore, real time quantitative PCR revealed that 90 minutes of FF induced a significant increase in Cx43 gene expression (Figure 3A). However, compared with unstressed cells, western blot quantification of Cx43 protein suggested that there was a slight increase at the protein level and no significant effect on Cx43 phosphorylation (Figure 3B). Because phosphorylation and dephosphorylation events are related to Cx43 activity and trafficking to the cell membrane, localization of Cx43 was further assessed by immunofluorescence. Results revealed a specific punctuated labeling of Cx43 in the cell membrane in static conditions (Figure 3C). After shear stress, Cx43 protein appeared to be more abundant and distributed both in the cytoplasm and cell membrane (Figure 3C).

MAPK Signaling Mediates Fluid Flow-Induced HBMSC Differentiation

Specific antibodies to ERK 1/2, p38 and their corresponding phosphorylated forms were used to examine regulation of these MAPK activities in response to shear stress. After the laminar FF, quantitative analysis of western blot showed a time-dependent increase in both p38 and ERK 1/2 phosphorylation (Figure 4). After 90 min of FF, phosphorylation was markedly increased for both MAPK compared to static controls. Because these data suggested a role for p38 and ERK 1/2 in flow induced-osteoblastic differentiation, HBMSCs were then exposed

with 20 μ M PD98089 or 20 μ M SB203580, which inhibit ERK1/2 and p38 activity respectively, for 1 hour prior to and during the application of FF. These concentrations were tested first for their absence of cytotoxicity and inhibitory activities (data not shown). The p38 inhibitor significantly abolished the flow-induced ALP gene expression (Figure 4). On the other hand, inhibition of ERK1/2 abolished the type I collagen down-regulation expression observed on stressed cells compared to unstressed cells.

Discussion

The ability of human mesenchymal stem cells to modulate osteoblastic function in response to shear stress remains a matter of debate. Here, we applied FF for 30 and 90 min using a parallel plate culture chamber to investigate the capacity of shear stress to regulate osteoblastic differentiation of HBMSCs and to examine some specific pathways required in this mechanotransduction.

Since mechanical loading applied by stretching has been shown to increase Cbfa1/Runx2 expression in a variety of cells related to differentiated osteoblasts or osteocytes [Ziros et al., 2002], we investigated this gene expression in HBMSCs submitted to FF. However, we found no effect of shear stress on Cbfa1/Runx2 gene expression over the time period tested. Recently, Mehrotra et al. [Mehrotra et al., 2006] examined the role of Cbfa1/Runx2 and showed that transcriptional activity of Cbfa1/Runx2 appeared to be essential for fluid shear stress induction, while it has no effect on Cbfa1/Runx2 mRNA or protein levels. On the other hand, studies examining the role of FF in modulating ALP expression have provided conflicting evidence. The osteoblastic cell line exposed to fluid shear stress showed no significant alteration in ALP activity rather than an increase in the expression of Cbfa1/Runx2 or osterix [Fan et al., 2006]. Jackson et al. [Jackson et al., 2006] recently found that loading increased cell proliferation and several bone specific markers including ALP activity and type

I collagen synthesis. Kapur et al. [Kapur et al., 2003] showed that primary human osteoblasts respond to physiological levels of shear stress with a significant increase in ALP activity. On the contrary, Hillsley and Frangos [Hillsley and Frangos, 1997] showed that ALP in primary rat osteoblasts is down-regulated by pulsatile flow. Taken together, all these studies confirm that a variation of perfusion regimen modulates bone marker expression and excites different mechanotransductive signaling pathways [Kreke et al., 2008].

In our study, a continuous shear stress applied to HBMSCs for 90 min rapidly modified ALP expression, while it did not exert any significant effect on Cbfa1/Runx2 expression and therefore decreased type I collagen mRNA level. The maximal induction of ALP mRNA occurred after 30 min of FF. Taken together, these data suggest that ALP expression can be uncoupled from type I collagen and from Cbfa1/Runx2 expression in these dynamic conditions, as previously demonstrated in co-culture conditions with human umbilical vein endothelial cells [Guillotin et al., 2008]. This suggests that Cbfa1/Runx2 function, may not account either directly or indirectly for ALP stimulation under conditions of shear stress.

Taylor et al. [Taylor et al., 2007] demonstrated that fluid shear stress increased the ALP activity of osteoblasts only when they were in co-culture with osteocytes but not with other mesenchymal stem cells. Interestingly, they demonstrated that osteocytic-osteoblastic physical contact and gap junctional communication (GJC) between these two cell types are a prerequisite for this increase. They hypothesized, therefore, that the ability to mediate osteoblastic ALP levels in response to the application of shear stress may result from differing levels of GJC within these cells.

Accumulative evidence suggests that GJP play a major role on bone cell differentiation [Gramsch et al., 2001; Jackson et al., 2006]. We showed that HBMSCs mainly express Cx43 in gap junctions [Guillotin et al., 2004; Villars et al., 2002]. Our previous paper [Villars et al., 2002] showed the role of Cx43 on ALP inducing activity in co-culture between HBMSCs and

endothelial cells by using an anti-sense oligodeoxyribonucleotide strategy. Here, FF alkaline phosphatase induction could result from an increase in gap junctional activity in HBMSCs or to a regulation of Cx43 expression.

Cherian et al. [Cherian et al., 2005] demonstrated in an osteocyte cell line that mechanical strain opens Cx43 hemichannels which allow the release of prostaglandin. Here, FF up-regulated Cx43 gene expression in HBMSCs, consistent with an osteoblastic activity increase as previously demonstrated [Gramsch et al., 2001]. Indeed, western blot quantification suggested that there was a slight increase at the protein level but no significant effect on Cx43 phosphorylation [Solan and Lampe, 2007]. Since Thi et al. [Thi et al., 2003] reported that FF can directly affect the membrane localization, we investigated the distribution of Cx43 through the cells. Immunofluorescence analysis of Cx43 in stressed cells and controls did not lead to any firm conclusions about Cx43 trafficking and but did show a putative increase in synthesis in stressed cells both in the cytoplasm and the membrane, while static conditions contributed to Cx43 membrane accumulation. However, cell surface biotinylation analysis of Cx43 would throw more light on the effect of shear stress on Cx43 trafficking, as already observed for osteocytes [Cherian et al., 2005].

Interestingly, the level of FF that increased ALP expression and decreased type I collagen on HBMSCs was associated with phosphorylation of p38 and ERK 1/2. Although the FF-induced increase of ALP expression was blocked by using the p38 inhibitor, the ERK1/2 inhibitor had no significant effect. Moreover, the latter abolished the down-regulation of the type I collagen mRNA level observed in stressed cells. Thus it appears that functional p38 and ERK1/2 signaling are both required for HBMSCs to respond to these mechanical signals and regulate their osteoblastic phenotype, although the exact role of these two MAPK signaling pathways involved in ALP and type I collagen regulation remains undetermined.

In summary, our results provide novel information in the field of mechanotransduction in human bone mesenchymal stem cells. These stimuli might excite different signaling pathways related to bone cell differentiation. The findings are particularly crucial for bone tissue engineering. To define new approaches for bone tissue engineering in which bioartificial organs capable of functional load bearing are created, it is important to use cells responding to the local forces within the tissue. Hence, biophysical stimuli need to be optimized to ensure rapid and strong tissue regeneration. However, differentiated osteoblast and osteocyte cell lines, i.e. the first choice in mechanosensory bone cells, cannot be used to produce bone tissue-engineered products. Human mesenchymal stem cells arising from bone marrow are good reparative cells and their responsiveness to mechanical strain has to be taken into consideration before using them to generate new functional tissues.

Acknowledgements

This work was supported by grants from INSERM and ANR PNANO “NANOBONEFILLER”. The authors thank Richard Daculsi for his helpful input.

References

- Alford A I, Jacobs, C R and Donahue, H J, (2003) Oscillating fluid flow regulates gap junction communication in osteocytic MLO-Y4 cells by an ERK1/2 MAP kinase-dependent mechanism small star, filled. *Bone* **33**, 64-70.
- Batra N N, Li, Y J, Yellowley, C E, You, L, Malone, A M, Kim, C H and Jacobs, C R, (2005) Effects of short-term recovery periods on fluid-induced signaling in osteoblastic cells. *J Biomech* **38**, 1909-17.
- Bonewald L F, (2007) Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci* **1116**, 281-90.
- Burger E H and Klein-Nulend, J, (1999) Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *Faseb J* **13 Suppl**, S101-12.
- Cherian P P, Cheng, B, Gu, S, Sprague, E, Bonewald, L F and Jiang, J X, (2003) Effects of mechanical strain on the function of Gap junctions in osteocytes are mediated through the prostaglandin EP2 receptor. *J Biol Chem* **278**, 43146-56.
- Cherian P P, Siller-Jackson, A J, Gu, S, Wang, X, Bonewald, L F, Sprague, E and Jiang, J X, (2005) Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell* **16**, 3100-6.

- Daculsi R, Grellier, M, Remy, M, Bareille, R, Pierron, D, Fernandez, P and Bordenave, L, (2008) Unusual transduction response of progenitor-derived and mature endothelial cells exposed to laminar pulsatile shear stress. *J Biomech* **41**, 2781-5.
- Fan X, Rahnert, J A, Murphy, T C, Nanes, M S, Greenfield, E M and Rubin, J, (2006) Response to mechanical strain in an immortalized pre-osteoblast cell is dependent on ERK1/2. *J Cell Physiol* **207**, 454-60.
- Frangos J A, McIntire, L V and Eskin, S G, (1988) Shear stress induced stimulation of mammalian cell metabolism. *Biotechnol Bioeng* **32**, 1053-60.
- Gramsch B, Gabriel, H D, Wiemann, M, Grummer, R, Winterhager, E, Bingmann, D and Schirmacher, K, (2001) Enhancement of connexin 43 expression increases proliferation and differentiation of an osteoblast-like cell line. *Exp Cell Res* **264**, 397-407.
- Guillotin B, Bareille, R, Bourget, C, Bordenave, L and Amedee, J, (2008) Interaction between human umbilical vein endothelial cells and human osteoprogenitors triggers pleiotropic effect that may support osteoblastic function. *Bone*
- Guillotin B, Bourget, C, Remy-Zolghadri, M, Bareille, R, Fernandez, P, Conrad, V and Amedee-Vilamitjana, J, (2004) Human primary endothelial cells stimulate human osteoprogenitor cell differentiation. *Cell Physiol Biochem* **14**, 325-32.
- Hillsley M V and Frangos, J A, (1997) Alkaline phosphatase in osteoblasts is down-regulated by pulsatile fluid flow. *Calcif Tissue Int* **60**, 48-53.
- Jackson R A, Kumarasuriyar, A, Nurcombe, V and Cool, S M, (2006) Long-term loading inhibits ERK1/2 phosphorylation and increases FGFR3 expression in MC3T3-E1 osteoblast cells. *J Cell Physiol* **209**, 894-904.
- Kapur S, Baylink, D J and Lau, K H, (2003) Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways. *Bone* **32**, 241-51.
- Kreke M R, Sharp, L A, Lee, Y W and Goldstein, A S, (2008) Effect of intermittent shear stress on mechanotransductive signaling and osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A* **14**, 529-37.
- Li Y J, Batra, N N, You, L, Meier, S C, Coe, I A, Yellowley, C E and Jacobs, C R, (2004) Oscillatory fluid flow affects human marrow stromal cell proliferation and differentiation. *J Orthop Res* **22**, 1283-9.
- McGarry J G, Klein-Nulend, J and Prendergast, P J, (2005) The effect of cytoskeletal disruption on pulsatile fluid flow-induced nitric oxide and prostaglandin E2 release in osteocytes and osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **330**, 341-8.
- Mehrotra M, Saegusa, M, Voznesensky, O and Pilbeam, C, (2006) Role of Cbfa1/Runx2 in the fluid shear stress induction of COX-2 in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **341**, 1225-30.
- Myers K A, Rattner, J B, Shrive, N G and Hart, D A, (2007) Osteoblast-like cells and fluid flow: cytoskeleton-dependent shear sensitivity. *Biochem Biophys Res Commun* **364**, 214-9.
- Ponik S and Pavalko, F, (2002)
- Riddle R C, Taylor, A F, Genetos, D C and Donahue, H J, (2006) MAP kinase and calcium signaling mediate fluid flow-induced human mesenchymal stem cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**, C776-84.
- Robling A G, Castillo, A B and Turner, C H, (2006) Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng* **8**, 455-98.
- Simmons C A, Matlis, S, Thornton, A J, Chen, S, Wang, C Y and Mooney, D J, (2003) Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cells via the

- extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signaling pathway. *J Biomech* **36**, 1087-96.
- Solan J L and Lampe, P D, (2007) Key connexin 43 phosphorylation events regulate the gap junction life cycle. *J Membr Biol* **217**, 35-41.
- Tanaka S M, Sun, H B, Roeder, R K, Burr, D B, Turner, C H and Yokota, H, (2005) Osteoblast responses one hour after load-induced fluid flow in a three-dimensional porous matrix. *Calcif Tissue Int* **76**, 261-71.
- Taylor A F, Saunders, M M, Shingle, D L, Cimbala, J M, Zhou, Z and Donahue, H J, (2007) Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C545-52.
- Thi M M, Kojima, T, Cowin, S C, Weinbaum, S and Spray, D C, (2003) Fluid shear stress remodels expression and function of junctional proteins in cultured bone cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C389-403.
- Villars F, Bordenave, L, Bareille, R and Amedee, J, (2000) Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF? *J Cell Biochem* **79**, 672-85.
- Villars F, Guillotin, B, Amedee, T, Dutoya, S, Bordenave, L, Bareille, R and Amedee, J, (2002) Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C775-85.
- Weinbaum S, Cowin, S C and Zeng, Y, (1994) A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *J Biomech* **27**, 339-60.
- Ziros P G, Gil, A P, Georgakopoulos, T, Habeos, I, Kletsas, D, Basdra, E K and Papavassiliou, A G, (2002) The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells. *J Biol Chem* **277**, 23934-41.

Figure legends**Figure 1**

Flow chamber adapted from Frangos et al. [Frangos et al., 1988]. A glass slide was seeded with cells that formed a confluent monolayer. Then, the slide formed the top of the flow chamber which was created by sandwiching a silicone gasket between the glass slide and an acrylic plate. Human bone marrow stem cells (HBMSCs) were subjected to the laminar shear stress of 12 dynes/cm² for 30 and 90 min at 37°C and control cells were placed in static conditions for the same period.

Figure 2

Gene expression of type I collagen (Col 1), Cbfa1/Runx2 and ALP quantified by Q-PCR in HBMSCs in static conditions or submitted to fluid flow for 30 (FF30) and 90 (FF90) minutes at 12 dynes /cm². Data were normalized to P0 housekeeping gene expression of each condition and were quantified relatively to static conditions standardized to 1. A *p* value ≤0.05 (*) was considered to be statistically significant.

Figure 3

A: Gene expression of Cx43 quantified by Q-PCR in HBMSC in static conditions or submitted to fluid flow for 30 (FF30) and 90 (FF90) minutes. Data were normalized to P0 housekeeping gene expression of each condition and were quantified relatively to static conditions standardized to 1. **B:** Detection of phosphorylated and unphosphorylated forms of Cx43 protein by western blot and quantification relatively to α-tubulin expression. **C:** Immunostaining of Cx43 in unstressed cells (static) or stressed cells for 90 min at 12 dynes /cm² (FF 90). The arrows show a specific punctuated labeling of Cx43 in membranes in static conditions. Cx43 protein seemed to be more expressed and distributed both in cytoplasm and

membrane after 90 min of shear stress (FF90) compared to static conditions. A p value ≤ 0.05 (*) was considered to be statistically significant.

Figure 4

Detection of both phosphorylated and unphosphorylated forms of p38 and ERK1/2 by western blot and quantification relatively to α -tubulin in static conditions (static) and after 30 min (FF30) or 90 min (FF90) of shear stress. A p value ≤ 0.01 (**) was considered to be statistically significant.

Figure 5

Gene expression of ALP and type I collagen (Col1) quantified by Q-PCR in HBMSC in static conditions, submitted to shear stress for 90 minutes in presence or not of 20 μ M PD98089 (+PD) or 20 μ M SB203580 (+SB), respectively inhibitors to ERK1/2 and p38 activity. Data were normalized to P0 housekeeping gene expression of each condition and were quantified relatively to static conditions standardized to 1. A p value ≤ 0.05 (*) was considered to be statistically significant.

Table 1. Primer sequences used for Q- PCR

Target	Gene Bank Accession nos	Sequence of primers		Annealing temperature
P0	<u>BC015690</u>	Forward	5' ATg CCC Agg gAA gAC Agg gC 3'	64°C
		Reverse	5' CCA TCA gCA CCA CAg CCT TC 3'	
ALP	<u>BC021289</u>	Forward	5' AgC CCT TCA CTg CCA TCC TgT 3'	64°C
		Reverse	5' ATT CTC TCg TTC ACC gCC CAC 3'	
Cx43	<u>BC026329</u>	Forward	5' ggg CgT TAA ggA TCg ggT TAA gg 3'	68°C
		Reverse	5' gTT ggT gAg gAg Cag CCA TTg AA 3'	
Coll I	<u>NC_000007</u>	Forward	5' Tgg ATg Agg AgA CTg gCA ACC 3'	64°C
		Reverse	5' TCA gCA CCA CCG ATg TCC AAA 3'	

Figure 1

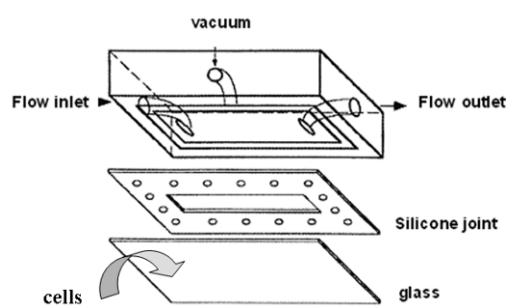


Figure 2

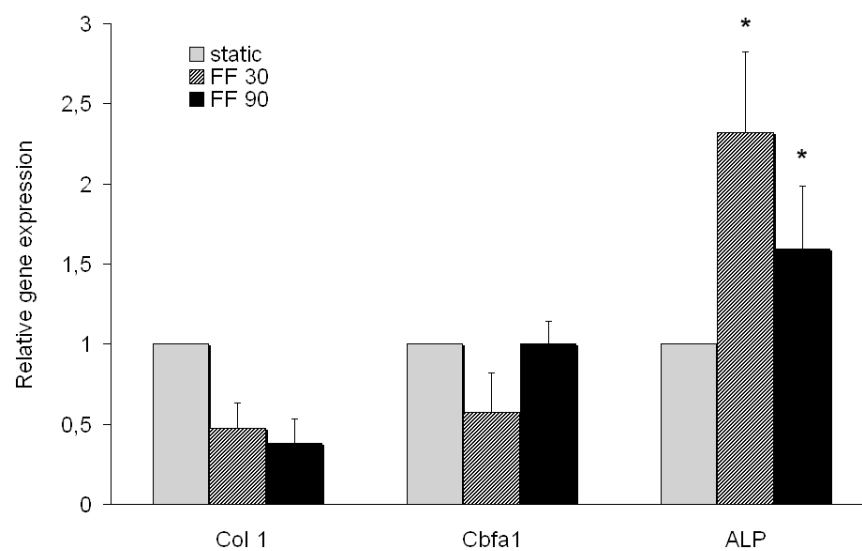


Figure 3

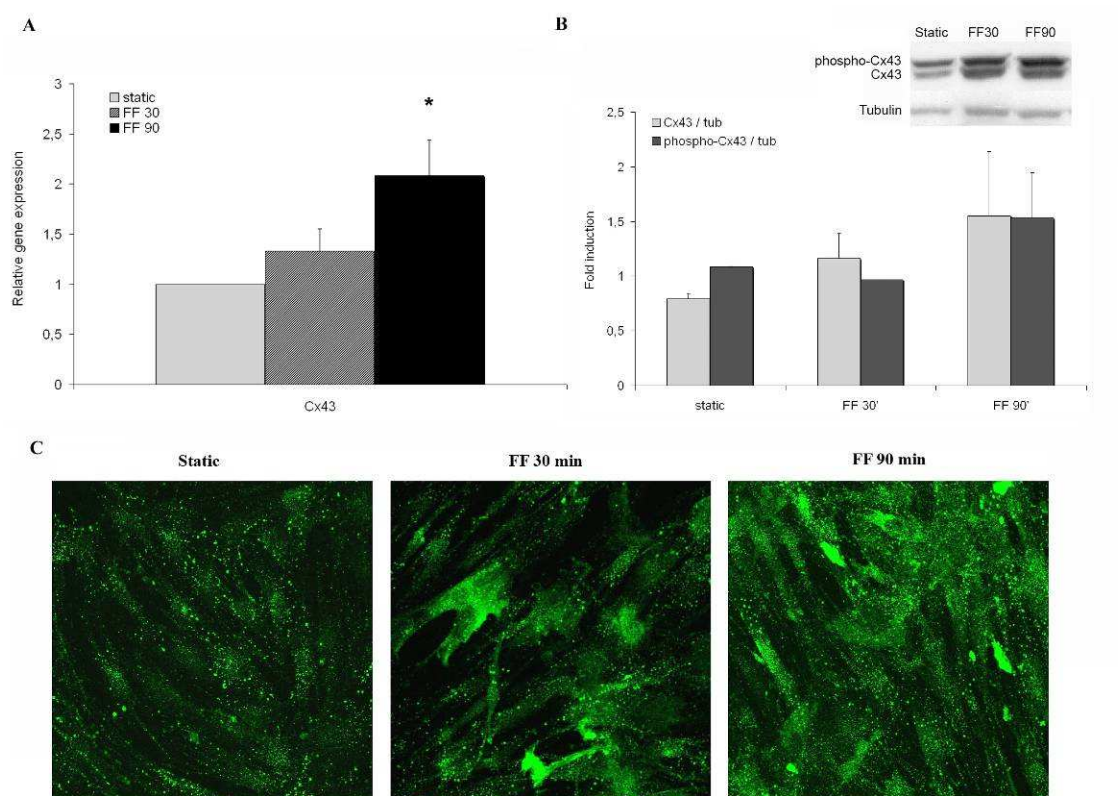


Figure 4

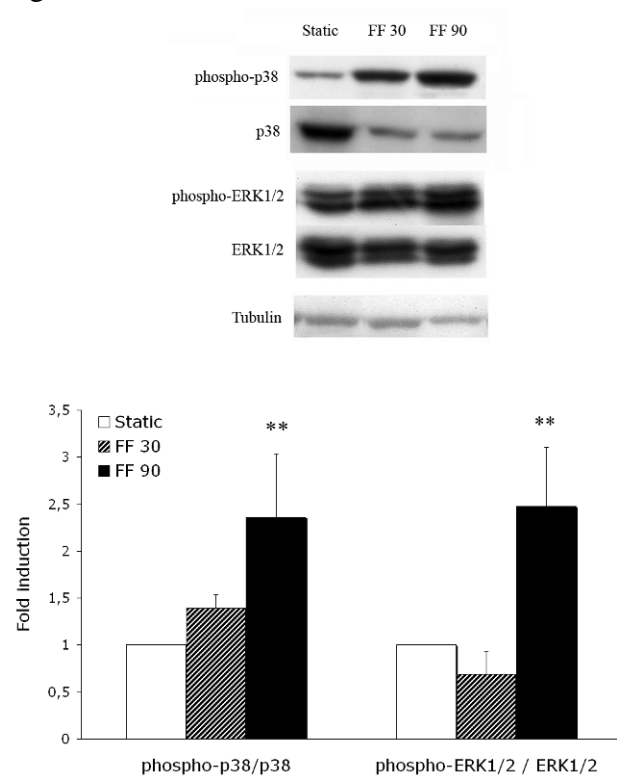
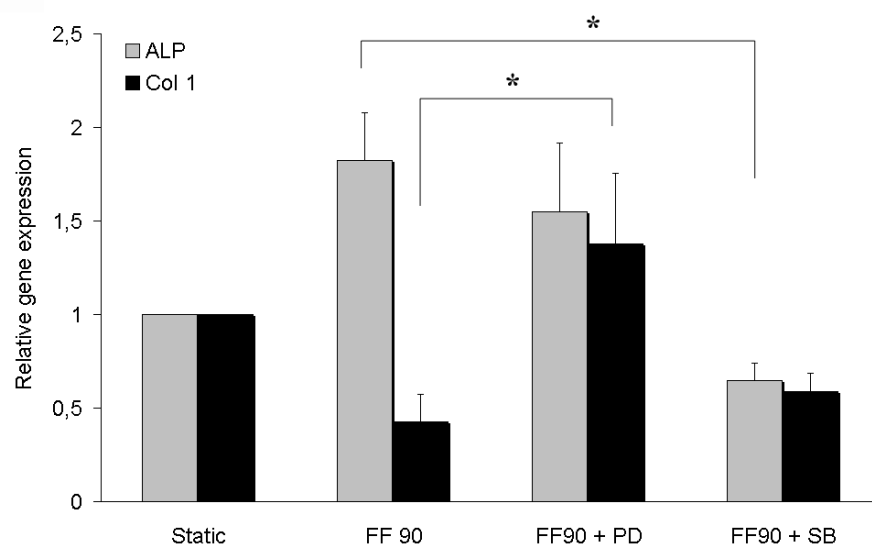


Figure 5



C. Conclusions

Dans ce travail, les cellules ostéoprogénitrices issues de moelle osseuse humaines ont été soumises à un flux laminaire physiologique de 12 dynes / cm² pendant 30 et 90 minutes et nous avons étudié la réponse des cellules à ces contraintes mécaniques. Les contraintes de cisaillement induisent la régulation de certains marqueurs ostéoblastiques. En effet, il a été observé une augmentation de l'expression de la PAL et une réduction du collagène de type I.

Les études s'intéressant au rôle des contraintes de cisaillement dans la régulation de la PAL sont assez contradictoires et les réponses varient selon le modèle cellulaire. Fan et al. ont montré que l'activité PAL de cellules pré-ostéoblastiques humaines soumises à des forces de cisaillement n'était pas modifiée alors que l'expression de Cbfa1/Runx2 ou ostérix étaient régulées [Fan et al., 2006]. Par contre, il a été démontré que les forces mécaniques stimulaient la prolifération cellulaire et l'expression de marqueurs tels que la PAL dans les ostéoblastes matures issus de mandibule humaine [Kapur et al., 2003], et le collagène de type I dans une lignée de MC3T3 [Jackson et al., 2006]. Au contraire, l'expression de la PAL dans les ostéoblastes murins diminue après un flux pulsatile [Hillsley and Frangos, 1997]. L'ensemble de ces travaux confirment que les contraintes mécaniques modulent l'activité des ostéoblastes et que ces cellules sont capables de transformer un signal mécanique en signal biochimique [Kreke et al., 2008].

Cependant, nos résultats suggèrent que l'expression de Cbfa1/Runx2 n'est pas modifiée après stimulation des cellules par les contraintes de cisaillement contrairement aux résultats de travaux publiés par Ziros et al. [Ziros et al., 2002]. Plus récemment, il a été montré que l'activité transcriptionnelle de Cbfa1/Runx2, et non son niveau d'expression, est essentielle pour la transduction de signal lors de contraintes de cisaillement [Mehrotra et al., 2006].

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'implication des MAPK telles que p38 et ERK1/2 dans la régulation du phénotype ostéoblastique sous contraintes mécaniques. La phosphorylation des MAPK p38 et ERK1/2 est activée après 90 minutes de stimulation des cellules par le flux laminaire. Pour identifier plus précisément le rôle de chacune des MAPK, les cellules ont été incubées en présence des inhibiteurs de ces deux MAPK (p38 ou ERK1/2) avant et pendant la stimulation par le flux laminaire. Ceci a permis de mettre en évidence que l'augmentation de l'expression de la PAL serait dépendante de l'activité de p38 alors que la diminution de l'expression de col-I serait dépendante de ERK1/2. Ces résultats suggèrent que les deux voies de signalisation des MAPK p38 et ERK1/2 sont impliquées dans la réponse aux forces mécaniques. Néanmoins, le rôle exact de ces deux voies de signalisation qui mènent à l'induction de l'expression de la PAL et à l'inhibition de col-1 est encore indéterminée.

Une autre voie de signalisation sollicitée dans ces mécanismes de régulation de la PAL pourrait être liée à l'existence de jonctions communicantes entre les cellules ostéoprogénitrices. En effet, plusieurs travaux montrent que les jonctions de type gap formées par les connexines sont essentielles à la régulation de la différenciation ostéoblastique et notamment de l'activité de la PAL en réponse aux contraintes de cisaillement [Gramsch et al., 2001; Jackson et al., 2006; Taylor et al., 2007].

Nos travaux précédents ont également suggéré que l'augmentation de la PAL observée dans les co-culture des cellules ostéoprogénitrices et des cellules endothéliales était

dépendante de l'activité de la connexine 43 [Guillotin et al., 2004; Villars et al., 2002]. Dans notre travail, les contraintes de cisaillement induisent l'augmentation de la PAL qui pourrait être le résultat de l'activité des jonctions communicantes existantes entre les cellules ostéoprogénitrices humaines.

Cette hypothèse pourrait être confirmée par l'augmentation de l'expression de la Cx43 observée dans les cellules HOPs soumises aux contraintes de cisaillement. Son expression génique semble être stimulée après 90 minutes de flux à 12 dynes/cm² ainsi que son expression au niveau protéique, dans ses formes phosphorylées ou non. De plus, l'analyse par immunofluorescence révèle que sa localisation intracellulaire est différente suivant les conditions de culture. En effet, en conditions statiques, la connexine 43 est majoritairement localisée à la membrane et impliquée dans la communication intercellulaire. Après 60 et 90 minutes de contraintes de cisaillement, la connexine 43 est largement présente au niveau de la membrane plasmique mais aussi au niveau du cytoplasme. Une des perspectives directe de ce travail sera d'étudier le taux de connexine 43 présente à la membrane par des expériences de biotinylation des protéines membranaires. Ceci pourra nous permettre de conclure quant à l'effet des contraintes de cisaillement sur la localisation de cette protéine comme il l'a été observé dans les ostéocytes [Cherian et al., 2005].

En conclusion, nos résultats apportent de nouvelles données dans le domaine de la mécanotransduction des cellules ostéoprogénitrices issues de cellules mésenchymateuses humaines. Dans un contexte d'ingénierie du tissu osseux où un matériau hybride sera soumis aux contraintes mécaniques locales, il est essentiel que les cellules implantées soient capables de répondre à une stimulation mécanique afin de garantir la régénération d'un tissu fonctionnel.

Il reste néanmoins à étudier la réponse de ces cellules ostéoprogénitrices co-cultivées avec les cellules endothéliales après stimulation par des contraintes mécaniques. La première approche méthodologique serait d'étudier ces réponses cellulaires dans un même système de chambre bidimensionnelle.

Enfin, ces travaux doivent très rapidement conduire à l'étude de la mécanotransduction dans les modèles de cellules ostéoblastiques et endothéliales, co-cultivées dans une matrice 3D au sein d'un bioréacteur.

II. La communication ostéo-endothéliale dans un système de co-culture *in vitro* en double dimension

A. Introduction

Les travaux précédents réalisés au laboratoire ont montré que la co-culture entre cellules endothéliales humaines issues de la veine de cordon ombilical (HUVECs), et ostéoprogéniteurs issus de la moelle osseuse (HOPs) entraîne une régulation du phénotype ostéoblastique par une augmentation de la PAL et du collagène de type I et une diminution du Cbfa1/Runx2 et de l'ostéocalcine [Guillotin et al., 2004; Villars et al., 2000]. Parmi les différents modes de communication cellulaire (formation de jonctions intercellulaires, libération de facteurs solubles ou interactions avec la matrice extracellulaire), Villars et al. ont montré que les HUVECs et HOPs étaient capables d'établir des jonctions communicantes entre elles et que ces jonctions constituées notamment de connexine 43 étaient impliquées dans la régulation du phénotype ostéoblastique en co-culture [Villars et al., 2002].

Jusqu'à présent, la communication existante entre ces ostéoprogéniteurs humains et les HUVECs et orchestrée par la libération de facteurs solubles a été peu étudiée. Dans l'article présenté ci-après, nous nous sommes intéressés au rôle joué par les facteurs solubles sécrétés dans la co-culture, notamment à la fonction du VEGF₁₆₅, connu pour être exprimé par les cellules ostéoblastiques, pour son rôle angiogène et ses propriétés chimiotactiques.

B. Article



Journal of Cellular Biochemistry

**Role of Vascular Endothelial Growth Factor in the Communication between Human
Osteoprogenitors and Endothelial Cells**

Maritie Grellier^{1,2,*}, Nancy Ferreira-Tojais¹, Chantal Bourget¹, Reine Bareille¹, Fabien
Guillemot¹, Joëlle Amédée¹

¹INSERM, U577, Bordeaux and Université Victor Segalen Bordeaux 2, UMR-S577,
Bordeaux, F-33076, France

²INEB - Instituto de Engenharia Biomédica, Divisão de Biomateriais, Rua do Campo Alegre,
823, 4150-180 Porto, Portugal

Accepté

ABSTRACT

Proper bone remodeling requires an active process of angiogenesis which in turn supplies the necessary growth factors and stem cells. This tissue cooperation suggests a cross-talk between osteoblasts and endothelial cells. This work aims to identify the role of paracrine communication through Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in co-culture between osteoblastic and endothelial cells. Through a well defined direct contact co-culture model between Human OsteoProgenitors (HOPs) and Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs), we observed that HUVECs were able to migrate along HOPs, inducing the formation of specific tubular-like structures. VEGF₁₆₅ gene expression was detected in the HOPs, was up-regulated in the co-cultured HOPs and both Flt-1 and KDR gene expression increased in co-cultured HUVECs. However, the cell rearrangement observed in co-culture was promoted by a combination of soluble chemoattractive factors and not by VEGF₁₆₅ alone. Despite having no observable effect on endothelial cell tubular-like formation, VEGF appeared to have a crucial role in osteoblastic differentiation since the inhibition of its receptors reduced the co-culture-stimulated osteoblastic phenotype. This co-culture system appears to enhance both primary angiogenesis events and osteoblastic differentiation, thus allowing for the development of new strategies in vascularized bone tissue engineering.

INTRODUCTION

Bone remodeling consists of a balance of bone resorption and formation that occurs throughout life, not only in skeleton development but also in bone hemostasis and fracture healing. Bone formation is coordinated by osteoblasts and bone degradation is guaranteed by osteoclast activity. The formation and development of an active microvasculature is an essential stage for bone remodeling and fracture healing [Carano and Filvaroff, 2003; Gerber and Ferrara, 2000]. Angiogenesis, the formation of new blood vessels from pre-existing ones, allows for the restoration of blood flow to the fracture site and can modulate bone formation by the production of growth factors able to regulate osteoblastic activity, recruitment of stem cells and their orientation to the osteoblastic lineage [Fiedler et al., 2005]. Angiogenesis is modulated by a tight balance between pro- and anti-angiogenic factors and involves a cascade of events in which the migration of endothelial cells (ECs) is an initial event [Lamallice et al., 2007]. Chemotaxis refers to cell migration toward a gradient of soluble chemoattractants, such as Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) and angiopoietins [Cross and Claesson-Welsh, 2001]. VEGF is a major promoter of both physiological and pathological angiogenesis that belongs to a family of homodimeric proteins consisting of six members: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E and Placenta Growth Factor [Cross et al., 2003; Ferrara et al., 2003]. VEGF-A exists in five different isoforms: VEGF₁₄₅, VEGF₁₈₉ and VEGF₂₀₆ which are able to bind to the ExtraCellular Matrix (ECM) through heparin, VEGF₁₂₁ which is soluble and VEGF₁₆₅, which is the most abundant form and can be both soluble and bound to the ECM [Neufeld et al., 1999]. These isoforms are able to activate two different tyrosine kinase receptors: VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (KDR/Flk-1) [Cross et al., 2003]. Their activation induces their phosphorylation and leads to the transduction of different signals promoting cell migration or osteoblastic phenotype induction by enhancing angiogenesis [Clarkin et al., 2007; Mayr-Wohlfart et al., 2002; Street

et al., 2002]. Moreover, Bouletreau et al. (2002) demonstrated that VEGF is able to stimulate Bone Morphogenic Protein (BMP-2) production, which then enhances fracture healing [Bouletreau et al., 2002a].

To better understand the influence of angiogenesis on bone remodeling, we have developed a co-culture system in which Human OsteoProgenitors (HOPs) and ECs are in direct contact. These two types of cells can communicate through autocrine / paracrine soluble factors, cell-to-cell contact or through their interaction with the ECM. In previous studies, we showed that osteoblastic differentiation was regulated by cell-to-cell communication through gap junction and connexin43 activity [Guillotin et al., 2004; Villars et al., 2000; Villars et al., 2002]. Villars et al. demonstrated that exogenous VEGF had a positive effect on cell proliferation in this co-culture system [Villars et al., 2000].

This work aims to identify the paracrine role of VEGF in the communication between osteoblastic and endothelial cells. The cell-to-cell contact between HOPs and ECs is associated with the formation of specific cellular tubular-like networks. Our results showed that the cell rearrangement occurring in this co-culture was due to the migration of ECs through their attraction to the soluble factors secreted only in the co-culture conditions. Despite VEGF₁₆₅ and its receptors were up-regulated in the co-culture, this factor alone did not affect EC migration in isolated cultures. On the other hand, VEGF appeared to have a crucial role in co-culture-stimulated osteoblastic differentiation since inhibition of Flt-1 and KDR abolished ALP and Coll-I increased gene expression.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

After informed consent was obtained, human bone marrow was obtained by aspiration from the femoral diaphysis or iliac bone from patients undergoing hip prosthesis surgery after

trauma. Cells were separated into a single suspension by sequential passage through syringes fitted with 16-, 18-, and 21-gauge needles. The cells were then counted and plated at 10^5 cells/cm² in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco) supplemented with 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS), and incubated in a humidified atmosphere containing 5% (v/v) CO₂ at 37 °C. Human OsteoProgenitors (HOPs) were obtained after treatment with dexamethasone at 10^{-8} M for the first two weeks of culture to induce osteoblastic differentiation of adherent cells [Villars et al., 2000]. They express Cbfa1/Runx2, ALP and type I collagen but do not express osteocalcin which is a late marker.

ECs were isolated from human umbilical cord vein as described by Bordenave *et al.* [Bordenave et al., 1993] according to the procedure of Jaffe et al [Jaffe, 1980]. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) were cultured in IMDM supplemented with 20% (v/v) FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 0.4% (v/v) Endothelial Cell Growth Supplement / Heparin kit (PromoCell).

HOPs arising from the second subculture were co-cultured with HUVECs in IMDM containing 10% (v/v) FBS without growth factor. HOPs were co-cultured at a 1:2 ratio with HUVECs for 6 to 48 hours, in the same phase seeding, while HOP and HUVEC isolated cultures were used as controls. Co-culture of HOPs and Human Gingival Fibroblasts (HGFs) under the same conditions was used as a co-culture control.

Cell separation after co-culture HOPs / HUVECs

To evaluate the specific effect on each cell type after co-culture, we used magnetic beads coupled with an antibody against CD31, a specific protein of ECs, which is able to separate HUVECs from HOPs [Guillotin et al., 2008]. Briefly, cells in co-culture were harvested by trypsin treatment and incubated with 10 CD31-labelled magnetic beads / HUVEC for 30 minutes at 4°C under gentle stirring. After five washings with PBS 1X containing 0.1% (w/v) Bovine Serum Albumin (BSA) on a magnet, the supernatant fraction containing the co-

cultured HOPs (co-HOPs) was then separated from the bead fraction containing the co-cultured HUVECs (co-HUVECs).

Cell identification by cytochemical and immunostaining

Intracellular alkaline phosphatase (ALP) activity was detected in HOPs according to the technical support of the SIGMA diagnostic kit (85L-2). Immunostaining was performed in order to detect von Willebrand factor (vWf) in HUVECs raised to confluence. Isolated cultures of HOPs, HUVECs or co-cultures were fixed in 4 % (w/v) paraformaldehyde for 20 min at 4°C and permeabilized in methanol 100% for 5 min at room temperature. Fixed cells were incubated for 30 min in HBSS containing 1% (w/v) BSA, then for 1 hour at 37°C with primary antibody anti-vWf (rabbit anti-human, DAKO). Subsequently, cells were washed in HBSS and incubated with Alexa-488-conjugated goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes) for 1 hour at 37°C. At least five independent experiments were performed and cultures were examined with a fluorescence microscope (Nikon) equipped with the appropriate epifluorescence filter sets. Controls were performed without primary antibody.

Time lapse videomicroscopy

Before the time lapse videomicroscopy experiment, HUVECs were incubated with 0.2 µg/mL of Dil-Ac-LDL (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate -Acetylated - Low Density Lipoprotein, Harbor Bioproducts, USA) in culture medium for a minimum of 4 hours. Then, HUVECs stained with Dil-Ac-LDL and HOPs were seeded onto a glass slide in a specific chamber corresponding to the microscope (Leica, TCS SP5) and incubated at 37°C in a 5% CO₂ humid atmosphere with IMDM-10% FBS for 1 hour in order to obtain adherent cells. The chamber was settled on a thermostable plate on the microscope which allows for a constant temperature of 37°C in the chamber. The microscope was programmed to take a picture every 10 minutes for 48 hours in DIC and fluorescence to detect HUVECs. The

reconstruction of the resulting movie was made with the LAS-AF (Leica Advanced Suite-Advanced Fluorescence) software. Three independent experiments were conducted.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy (SEM) was carried out in order to study cell morphology and organization on the HOPs / HUVECs co-cultures in direct contact. Samples were fixed by immersion in a 2.5% (v/v) glutaraldehyde in a cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4). Samples were washed twice with cacodylate buffer, then dehydrated by successive immersions in ethanol solutions (from 30 to 100%), then incubated in hexamethyldisilazane (HMDS) for 30 seconds. Samples were coated by a gold layer and SEM analyses were carried out at 8 and 10 keV using a Hitachi (Tokyo, Japan) S-2500. SEM analysis was performed once and several fields of the cultures were observed.

Conditioned Medium (CM)

HOPs were co-cultured with HUVECs for 6, 24 and 48 hours as previously described. Supernatants obtained from these co-cultures were collected at the aforementioned time points, centrifuged for 5 minutes at 800g to eliminate cells and then frozen at -80°C until subsequent use. Isolated cultures of HOPs and HUVECs cultured for 24 hours were incubated with these different CMs from co-cultures diluted in fresh IMDM-10% FBS at a 1:1 ratio. Control experiments were performed using either IMDM-10% FBS, or CMs arising from HOPs cultures at 6, 24 and 48 hours. As for CMs from co-culture, these were mixed with IMDM-10% FBS at the same ratio (1:1) and incubated with HUVECs. At least four experiments were carried out for each condition.

Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (Q-PCR)

Total RNA were extracted using the RNeasy™ Total RNA kit (QIAGEN) and 1 µg was used as template for single-strand cDNA synthesis with the Superscript preamplification system (Gibco) in a 20 µl final volume containing 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2.5 mM

MgCl₂, 0.1 mg/ml BSA, 10 mM DTT, 0.5 mM of each dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.5 µg oligo(dT)₁₂₋₁₈, and 200 U of reverse transcriptase. After incubation at 42°C for 50 min, the reaction was stopped at 70°C for 15 min.

Five microliters of cDNA diluted at a 1:80 ratio were loaded in a 96-well plate. SYBR-Green Supermix® (2X iQ™, BioRad) was added to the final concentration of 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 0.2 mM of each dNTP, 25 units / ml iTaq™ DNA polymerase, 3 mM MgCl₂, SYBR™ Green I, 10 nM fluorescein, and stabilized in sterile distilled water. Primers of P0, VEGF₁₆₅, Flt-1, KDR, ALP and type-I collagen (Coll-I) were used at the final concentration of 200 nM; their sequences are summarized in Table 1. Data were analyzed with the iCycler IQ™ software and compared by the $\Delta\Delta C_t$ method. Each Q-PCR was performed in triplicate for PCR yield validation. Results were expressed relatively to gene expression level of HOPs after 6h of culture, which was standardized to 1. Three independent experiments were performed and significance was calculated by the Student test (*p≤0.05; **p≤0.01).

VEGF₁₆₅ detection using ELISA assay

VEGF₁₆₅ released by each type of cell was quantified using a specific ELISA assay (Quantikine, R&D Systems). Supernatants from three independent cultures of HOPs, HUVECs and co-cultures were collected and submitted to the immuno-enzymatic detection, according to the protocol described by the supplier. Results are expressed in pg of VEGF₁₆₅ per µg of total protein. IMDM-10% FBS was used as control.

VEGFR-1 and VEGFR-2 neutralizing antibodies

Co-culture of HOPs and HUVECs was performed as described above with culture medium containing neutralizing antibodies or not. Specific neutralizing antibodies against human VEGFR-1 or VEGFR-2 from R&D systems were used at 10 µg/mL and 0.5 µg/mL respectively. Cell organization was observed and cells were harvested after 6 and 48h of

culture and treated for Q-PCR analyses. These investigations were conducted on three independent experiments.

RESULTS

Endothelial cell migration is induced by soluble factors secreted only by co-culture HOPs/HUVECs

A cell rearrangement of HOPs and HUVECs was observed when they were co-cultured in direct contact, whereas no rearrangement was found when cultured separately (HOPs or HUVECs, Fig. 1A). Between 6h and 48h in isolated culture, HUVECs formed a typical cobblestone confluent monolayer and HOPs formed a homogeneous multilayer. However, direct contact co-cultures of these two cell types were clearly organized in specific tubular-like network after 48 hours (Fig. 1A). Moreover, this specific network was not observed when HOPs were co-cultured with HGFs. Staining of each cell type with vWF and ALP confirmed that co-cultured HOPs and HUVECs were organized in cellular multilayers (Fig. 1B).

HOPs / HUVECs in co-culture were monitored for 48 hours using time lapse videomicroscopy, permitting us to follow cell organization within the same culture area. To differentiate HOPs from HUVECs in co-culture, HUVECs were preliminarily labeled with Dil-Ac-LDL before cell seeding with HOPs. We observed that ECs were able to migrate and seemed to move along HOPs and their corresponding filopodia (Fig. 1C). SEM images confirmed that ECs used osteoblastic cells as a “matrix” upon which they could spread (Fig. 1D).

We then focused on the possible autocrine / paracrine role of soluble factors produced by the co-culture that could promote this specific cell organization. HUVECs or HOPs were cultured in the presence of Conditioned Medium (CM) from co-cultured HOPs/HUVECs after 6h, 24h or 48h. The incubation of HOPs with the CMs from co-culture did not interfere with cell

organization, whatever the time point of the CM used (6h, 24h, 48h, Fig. 2B, C, and D). However, HUVECs incubated with CM from 24h of co-culture (Fig. 2G) exhibited a cell rearrangement similar to the tubular-like network observed in co-culture (Fig.1A). The same cell organization was also observed when HUVECs were cultured in presence of CM from 48h of co-culture (Fig. 2H). Finally, we demonstrated that the incubation of HUVECs with CM from HOP culture alone had no effect on cell organization (Fig. 2 J, K and L).

VEGF₁₆₅ is secreted by HOPs and could activate VEGF receptors in co-cultured HUVECs

We wondered whether VEGF could be one of the secreted factors present in the co-culture supernatant contributing to cell migration. First, we measured the level of VEGF₁₆₅ gene expression in each cell type by Q-PCR. Total RNA were extracted from HOPs, HUVECs, co-cultured HOPs and co-cultured HUVECs, obtained after co-culture and subsequent cell separation using immuno-magnetic beads. As shown in figure 3A, HUVECs did not express VEGF₁₆₅ either in isolated cultures or when co-cultured with HOPs. Moreover, VEGF₁₆₅ mRNA expression was detected in HOPs isolated culture and was found to increase with time. Interestingly, cell contact between HOPs and HUVECs up-regulated VEGF₁₆₅ gene expression in co-cultured HOPs (Fig 3A).

The amount of VEGF₁₆₅ protein secreted in the corresponding supernatants of HOPs, HUVECs and their co-culture was also quantified. Surprisingly, ELISA assay revealed that VEGF₁₆₅ was detected only in the supernatant of osteoblastic cells, but not in HUVECs or in co-culture HOPs / HUVECs (Fig. 3B). The quantification of VEGF₁₆₅ secreted by isolated cultures of HOPs, HGFs and co-cultures of HOPs / HGFs was also performed as control. VEGF₁₆₅ was found to be present in the supernatant of these three different types of cultures (Fig. 3B) including that of the HOPs / HGFs. To further investigate the role of VEGF₁₆₅ signaling in co-cultured HOPs / HUVECs, we focused our efforts on the analysis of mRNA expression of Flt-1 and KDR in the different culture models. Gene expression of both

receptors remained constant with time in HOPs and HUVECs alone and in co-cultured HOPs (Fig 4). However, the expressions of Flt-1 and KDR were significantly up-regulated in co-cultured HUVECs compared to HUVECs alone (Fig. 4).

Role of VEGF in osteoblastic differentiation

To determine the specific role of VEGF in our co-culture system, HOPs, HUVECs and HOPs / HUVECs in co-culture were incubated with neutralizing antibodies against VEGF receptor 1 and 2. The inhibition of Flt-1 or KDR did not block the cell rearrangement in co-culture (data not shown). Furthermore, the addition of exogenous VEGF₁₆₅ (20 ng/mL) in HUVECs culture medium did not stimulate the formation of tubular-like structures as observed in co-culture (data not shown). On the other hand, the osteoblastic markers ALP and Coll-I were up-regulated in co-culture conditions (Fig. 5), an effect that was abolished by incubation with a specific Flt-1 neutralizing antibody. Moreover, neutralization of KDR led to a down-regulation of both osteoblastic markers in co-cultured HOPs / HUVECs when compared to untreated cells (Fig. 5).

DISCUSSION

Under our previously described conditions, the association of osteoprogenitors arising from bone marrow stromal cells in direct contact with HUVECs led to stimulation of osteoblastic differentiation [Guillotin et al., 2004; Villars et al., 2000; Villars et al., 2002]. In this work, we demonstrated that HOPs and HUVECs in direct co-culture also led to a cell rearrangement giving rise to tubular-like networks. This cellular network was also observed when HOPs were in co-culture with other types of ECs, such as Endothelial Precursor Cells isolated from blood cord (EPCs) and endothelial cells from Human Saphenous Vein (HSV) [Guillotin et al., 2004; Unger et al., 2007; Xin et al., 2001]. However, direct co-culture of HOPs and human gingival fibroblasts did not interfere with cell organization, thus in direct opposition to the

data presented by Sorell *et al.* [Sorrell et al., 2008]. Under our conditions, this cellular network formation appears to be specific of ECs.

In this paper, we focused on cell communication through paracrine / autocrine factors, which could exert a chemoattractive effect on ECs. We analyzed the effect of factors secreted in the culture medium of HOPs or co-cultured HOPs / HUVECs on cell migration. We showed that only the soluble factors secreted in the co-culture conditions induced EC migration and tubular-like network formation. Direct contact between HOPs and HUVECs thus appears necessary for the secretion of chemoattractive factors. Possible candidates for the promotion of EC migration include Epidermal Growth Factor (EGF), bFGF, Transforming Growth Factor β -1 (TGF β -1), Hepatocyte Growth Factor (HGF) or VEGF [Lebrin et al., 2005; Rousseau et al., 2000; Xin et al., 2001] .

We hypothesized that cell-to-cell contact through gap or adherens junctions could be involved in the secretion of soluble factors, including VEGF, which could influence angiogenesis [Carmeliet and Collen, 2000; Lampugnani et al., 2006; Suarez and Ballmer-Hofer, 2001; Walker et al., 2005]. We already observed cell-to-cell communication establishment between HOPs and HUVECs in co-culture through homotypic and heterotypic gap junctions [Guillotin et al., 2004; Villars et al., 2002] and a regulation of the cadherin signaling pathway (data not shown). Taken together, it seems plausible that these two modes of cell-to-cell communication could participate in the cell migration events in this co-culture system, in combination with the release of soluble factors.

Several studies also suggested that the ECM produced by HOPs plays a fundamental role in the sequestration and therefore secretion of chemotactic factors [Dallas et al., 2002; Ortega et al., 2003]. Direct contact co-culture could then stimulate the release of these chemotactic factors, which could in turn activate specific EC function such as cell migration [Lamallice et al., 2007; Miralem et al., 2001; Ortega et al., 2003; Sorrell et al., 2008; Sun et al., 2001; Wang

and Keiser, 1998]. Preliminary investigations concerning the study of ECM protein regulation, such as matrix metalloproteinases or their inhibitors, revealed a regulation of these factors and a need for clarification [Guillotin et al., 2008]. Here, SEM and time lapse videomicroscopy analyses confirmed that ECs are able to migrate along HOPs using either their filopodia or this newly-synthesized ECM. In addition, ECs migrated and organized themselves into a tubular-like network when in co-culture, as when they were cultured on matrigel (BD Biosciences, data not shown).

Having observed EC migration and tubular-like cellular network formation induced by soluble factors, we asked whether VEGF could be one of these secreted factors. Since VEGF₁₆₅ can be soluble and constitutes the predominant form of VEGF produced by the cells, we decided to quantify its expression. HUVECs proved not to express VEGF₁₆₅ mRNA either in isolated cultures or in co-cultures, a phenomenon already observed in a previous study [Villars et al., 2000]. The VEGF₁₆₅ gene was highly expressed by HOPs when in co-culture but the protein was not detected in the co-culture supernatant. We hypothesized that the protein was either not generated or was bound to the ECM and not available in soluble form. VEGF₁₆₅ protein was present in the supernatant of the control cultures, HOPs, HGFs and co-culture of HOPs / HGFs. We therefore concluded that VEGF₁₆₅ can be synthesized and secreted into the culture medium of the HOPs / HUVECs co-culture. Moreover, after 6, 24 or 48h, very little or no matrix is synthesized by the cells. VEGF₁₆₅ immunostaining appears to be mainly intracellular (data not shown) but we cannot exclude that one part of the secreted VEGF₁₆₅ is bound to the pericellular ECM in the co-culture system.

Moreover, the gene expression of Flt-1 and KDR was significantly up-regulated in co-cultured HUVECs compared to HUVECs alone. Taken together, these data suggested that VEGF₁₆₅ protein would be secreted by co-HOPs and might be immediately used by the cells

in co-culture HOPs / HUVECs to activate intracellular cell signaling and ECs migration [Clarkin et al., 2007; Gerhardt et al., 2003].

The data resulting from the addition of exogenous VEGF₁₆₅ showed that this factor alone was not sufficient to induce EC migration occurring in co-cultured HOPs / HUVECs. A combination of soluble factors produced by the two cell types in direct contact is necessary. However, VEGF appeared to be crucial for the enhancement of osteoblastic differentiation in co-culture conditions. Previous studies have already shown that osteoblastic differentiation is increased in co-cultured HOPs / HUVECs compared with HOPs alone [Guillotin et al., 2004; Villars et al., 2000; Villars et al., 2002]. In the present study, ALP and Coll-I up-regulations in Co-HOPs after 48h of co-culture, compared with HOPs cultured alone were dependent on the Flt-1 and KDR pathways, as already proposed by Wang et al [Wang et al., 1997].

In conclusion, our results show that the tubular-like network observed in co-cultured HOPs / HUVECs is associated with EC migration, and is promoted by soluble factors secreted only in co-culture conditions. Even though VEGF₁₆₅ and its receptors were up-regulated in the co-culture, VEGF₁₆₅ alone did not affect EC migration under our conditions. A combination of soluble factors is necessary for the co-culture cell rearrangement, and might include bFGF, TGF- β or HGF [Lebrin et al., 2005; Xin et al., 2001]. These soluble factors, which were secreted only when HOPs and HUVECs were co-cultured in direct contact, could be dependent upon the gap junctional activity established between the two cell types. In addition, the ECM could sequester and therefore release these components upon EC activity. Finally, VEGF appeared to play a crucial role in co-culture-stimulated osteoblastic differentiation, since inhibition of Flt-1 and KDR abolished ALP and Coll-I up-regulations.

This co-culture system appears to enhance both primary angiogenesis events and osteoblastic differentiation, and will thus allow us to set up new strategies for vascularized bone tissue engineering.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Grants from INSERM ANR PNANO and Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. The authors thank Mário A. Barbosa, Pedro L. Granja, from INEB, and Richard Daculsi for their kind discussions and Benjamin Pippenger and Ray Cooke for their help with the English corrections.

REFERENCES

- Bordenave L, Baquey C, Bareille R, Lefebvre F, Lauroua C, Guerin V, Rouais F, More N, Vergnes C, Anderson JM.1993. Endothelial cell compatibility testing of three different Pellethanes. *J Biomed Mater Res* 27:1367-81.
- Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA, Longaker MT.2002. Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg* 109:2384-97.
- Carano RA, Filvaroff EH.2003. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 8:980-9.
- Carmeliet P, Collen D.2000. Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin. *Ann N Y Acad Sci* 902:249-62; discussion 262-4.
- Clarkin CE, Emery RJ, Pitsillides AA, Wheeler-Jones CP.2007. Evaluation of VEGF-mediated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells. *J Cell Physiol*.
- Cross MJ, Claesson-Welsh L.2001. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 22:201-7.
- Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L.2003. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci* 28:488-94.
- Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, Bonewald LF.2002. Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta)-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix. *J Biol Chem* 277:21352-60.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J.2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9:669-76.
- Fiedler J, Leucht F, Waltenberger J, Dehio C, Brenner RE.2005. VEGF-A and PlGF-1 stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 334:561-8.
- Gerber HP, Ferrara N.2000. Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med* 10:223-8.
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C.2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 161:1163-77.
- Guillotin B, Bareille R, Bourget C, Bordenave L, Amedee J.2008. Interaction between human umbilical vein endothelial cells and human osteoprogenitors triggers pleiotropic effect that may support osteoblastic function. *Bone*.
- Guillotin B, Bourget C, Remy-Zolghadri M, Bareille R, Fernandez P, Conrad V, Amedee-Vilamitjana J.2004. Human primary endothelial cells stimulate human osteoprogenitor cell differentiation. *Cell Physiol Biochem* 14:325-32.
- Jaffe EA.1980. Culture of human endothelial cells. *Transplant Proc* 12:49-53.
- Lamallice L, Le Boeuf F, Huot J.2007. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res* 100:782-94.
- Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C, Dejana E.2006. Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol* 174:593-604.

- Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, Ten Dijke P.2005. TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* 65:599-608.
- Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Gunther KP, Dehio C, Puhl W, Brenner RE.2002. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone* 30:472-7.
- Miralem T, Steinberg R, Price D, Avraham H.2001. VEGF(165) requires extracellular matrix components to induce mitogenic effects and migratory response in breast cancer cells. *Oncogene* 20:5511-24.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z.1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 13:9-22.
- Ortega N, Behonick D, Stickens D, Werb Z.2003. How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 995:109-16.
- Rousseau S, Houle F, Huot J.2000. Integrating the VEGF signals leading to actin-based motility in vascular endothelial cells. *Trends Cardiovasc Med* 10:321-7.
- Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI.2008. Human dermal fibroblast subpopulations; differential interactions with vascular endothelial cells in coculture: nonsoluble factors in the extracellular matrix influence interactions. *Wound Repair Regen* 16:300-9.
- Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH.2002. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9656-61.
- Suarez S, Ballmer-Hofer K.2001. VEGF transiently disrupts gap junctional communication in endothelial cells. *J Cell Sci* 114:1229-35.
- Sun L, Vitolo M, Passaniti A.2001. Runt-related gene 2 in endothelial cells: inducible expression and specific regulation of cell migration and invasion. *Cancer Res* 61:4994-5001.
- Unger RE, Sartoris A, Peters K, Motta A, Migliaresi C, Kunkel M, Bulnheim U, Rychly J, Kirkpatrick CJ.2007. Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials* 28:3965-76.
- Villars F, Bordenave L, Bareille R, Amedee J.2000. Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF? *J Cell Biochem* 79:672-85.
- Villars F, Guillotin B, Amedee T, Dutoya S, Bordenave L, Bareille R, Amedee J.2002. Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C775-85.
- Walker DL, Vacha SJ, Kirby ML, Lo CW.2005. Connexin43 deficiency causes dysregulation of coronary vasculogenesis. *Dev Biol* 284:479-98.
- Wang DS, Miura M, Demura H, Sato K.1997. Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells. *Endocrinology* 138:2953-62.
- Wang H, Keiser JA.1998. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1. *Circ Res* 83:832-40.
- Xin X, Yang S, Ingle G, Zlot C, Rangell L, Kowalski J, Schwall R, Ferrara N, Gerritsen ME.2001. Hepatocyte growth factor enhances vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo. *Am J Pathol* 158:1111-20.

Table 1: Primer sequences used in Q-PCR.

Transcript	GenBank	Primers sequences	TM (°C)
P0	<u>BC015690</u>	forward 5' ATGCCCAGGGAAGACAGGGC 3' reverse 5' CCATCAGCACCCACAGCCTTC 3'	65
VEGF ₁₆₅	<u>AB021221</u>	forward 5' TATGCGGATCAAACCTCACCA 3' reverse 5' CACAGGGATTTTCTTGCTCTTGCT 3'	58
Flt-1	<u>AF063657</u>	forward 5' CAGGCCAGTTTCTGCCATT 3' reverse 5' AAGGTCGAGTCGCACCAGCAT 3'	65
KDR	<u>AF063658</u>	forward 5' CCAGCAAAAGCAGGGAGTCTGT 3' reverse 5' ACAGACACAGTAGCCTCACTATAGG 3'	62
ALP	<u>BC021289</u>	forward 5' AGC CCT TCA CTG CCA TCC TGT 3' reverse 5' ATT CTC TCG TTC ACC GCC CAC 3'	64
Coll-I	<u>NM000089</u>	forward 5' GGA ATG AGG AGA CTG GCA ACC 3' reverse 5' TCA GCA CCA CCG ATG TCC AAA 3'	65

FIGURE LEGENDS**Fig. 1: Observation of cell migration by microscopy.**

A: Cultures of HUVECs, HOPs, HGFs, and co-cultures of HOPs / HUVECs or HOPs / HGFs in direct contact. Each observation was performed after 6, 24 and 48 hours of culture. Specific tubular-like networks were formed after 24h of co-culture HOPs / HUVECs but not when HOPs were co-cultured with HGFs. Magnification x100. **B:** Detection of the localization of each type of cell by ALP activity and immunostaining of vWf in HOPs, HUVECs and co-cultures after 48h of culture. The stainings confirm that the cells are organized in a multilayer. (Magnification x100). **C:** Time lapse videomicroscopy proceeded after 20 hours of seeding of HOPs co-cultured with HUVECs labeled with Dil-Ac-LDL. Arrows show that ECs are able to migrate along HOPs or their extracellular matrix. (Magnification x200). **D:** SEM analyses of HOPs, HUVECs and co-culture after 48 hours of culture. White arrow shows osteoblastic cell and black arrow shows EC spread over HOPs.

Fig. 2: Effect of released factors on endothelial cell migration

A, E and I: HOPs (A) or HUVECs (E and I) were incubated for 24 hours with control medium IMDM-10% FBS. **B, C and D:** HOPs isolated cultures were incubated for 24 hours with Conditioned Medium (CM) from co-cultures after 6h, 24h and 48h. **F, G, H, J, K and L:** HUVEC isolated cultures were incubated for 24 hours with CM from co-cultures 6h, 24h and 48h (F, G and H) or with CM from HOPs cultures 6h, 24h and 48h (J, K and L). We noticed that factors secreted only by the co-culture can induce ECs migration and the cell rearrangement similar to the tubular-like networks as observed in co-culture.

Fig. 3: Regulation of mRNA expression of VEGF₁₆₅ in co-culture

A: mRNA expression of VEGF₁₆₅ quantified by Q-PCR in HOPs and HUVECs isolated cultures and in HOPs and HUVECs arising from cell separation after co-culture (respectively co-HOPs and co-HUVECs). Data was normalized to P0 mRNA expression of each condition and was quantified relative to VEGF₁₆₅ mRNA expression in HOPs after 6h of culture, which was standardized to 1. VEGF₁₆₅ gene expression increased with time in HOPs and was up-regulated in co-cultured HOPs **B:** Quantification of VEGF₁₆₅ protein by ELISA assay in supernatant of HOPs, HUVECs, and co-culture of HOPs / HUVECs after 6, 24, 48 and 72 hours. VEGF₁₆₅ was also quantified in control cultures of HOPs, HGFs and co-culture HOPs / HGFs at the same time points. The data is expressed in ng of VEGF₁₆₅ per µg of protein in cell lysate. VEGF₁₆₅ was not detected in the supernatant of co-culture HOPs / HUVECs, while its mRNA was expressed. Co-culture control of HOPs / HGFs confirms that VEGF₁₆₅ can be secreted and is probably immediately used by the cells in the co-culture HOPs / HUVECs.

Fig. 4: mRNA expression of Flt-1 and KDR.

Gene expression of VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in HOPs, HUVECs, co-HOPs and co-HUVECs after 6, 24 and 48 hours of culture were quantified by Q-PCR. Data was normalized to P0 mRNA expression of each condition and was quantified relative to Flt-1 or KDR gene expression of HOPs after 6h of culture which was standardized to 1. Flt-1 and KDR gene expression was significantly up-regulated in HUVECs when they were co-cultured with HOPs. Value means \pm SD of three separate experiments (* $p \leq 0.05$, against HUVECs in corresponding time points).

Fig.5: Effect of VEGFR neutralizing antibodies on ALP and Coll-I gene expression

Gene expression of ALP and Coll-I, in HOPs, HUVECs, co-HOPs and co-HUVECs cultured for 6 and 48 hours with or without neutralizing antibodies against Flt-1 or KDR. Data was normalized to P0 mRNA expression of each condition and was quantified relative to ALP or Coll-I gene expression of HOPs after 6h of culture, which was standardized to 1. Flt-1 neutralizing antibody inhibited the increase of ALP and Coll-I in co-HOPs and neutralization of KDR led to a down-regulation of both factors. Value means \pm SD of three separate experiments (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

FIGURES

Figure 1

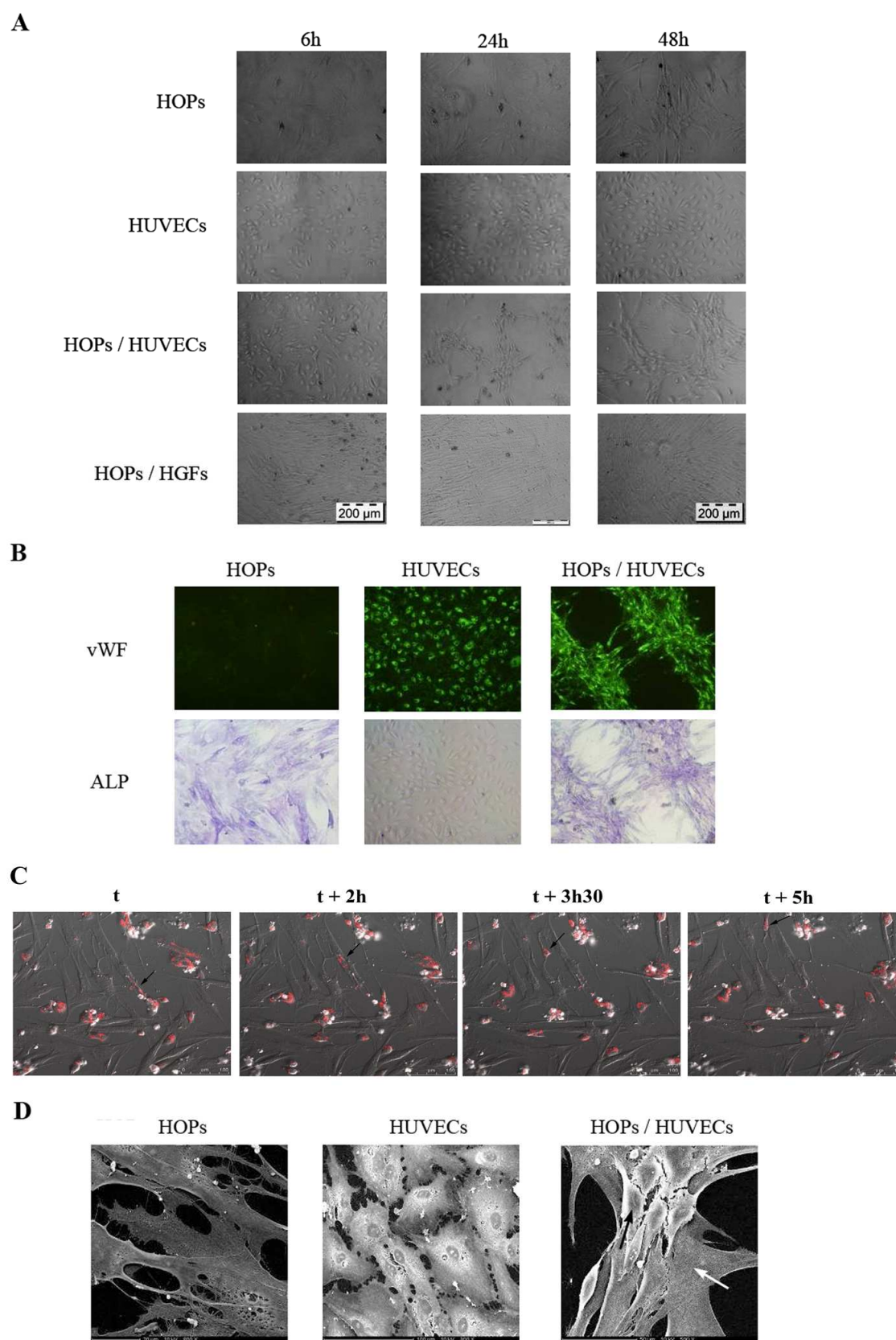


Figure 2

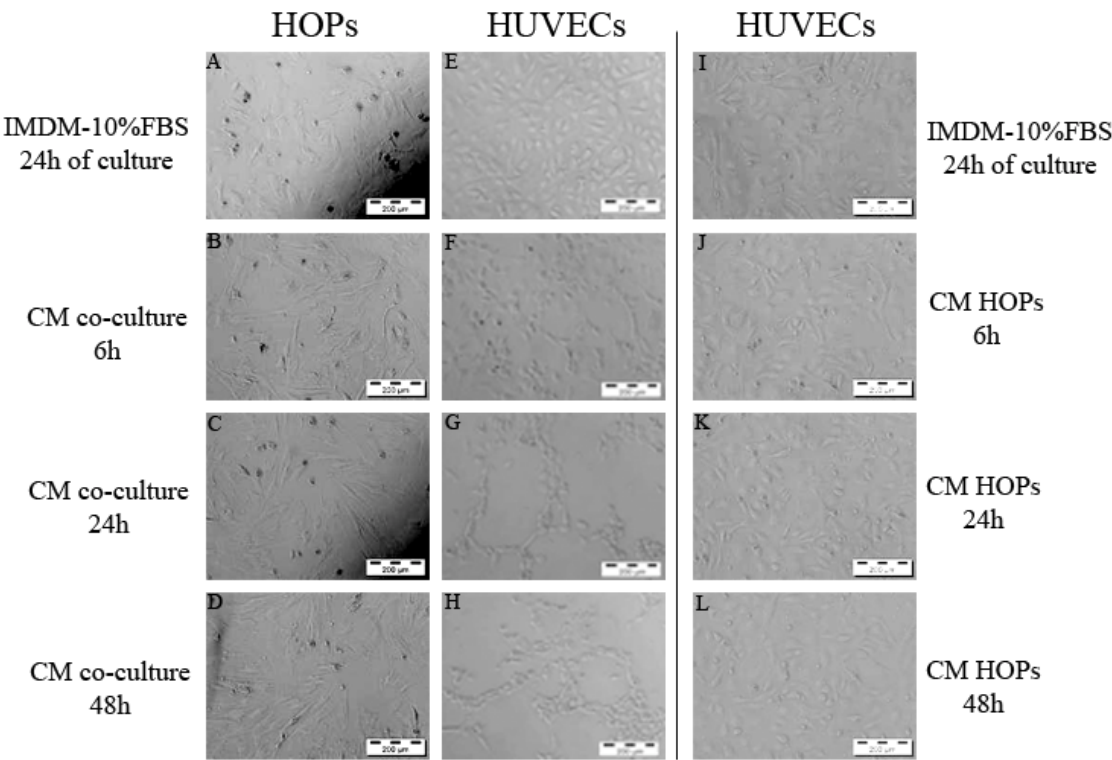


Figure 3

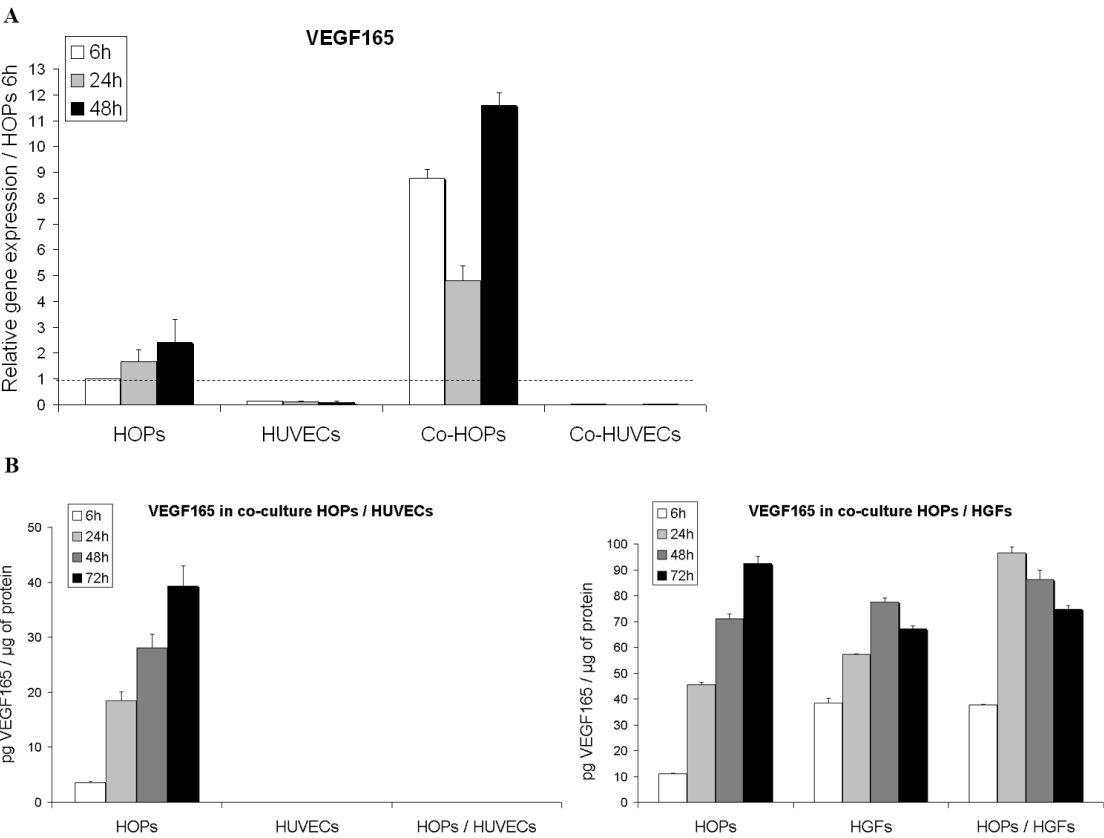


Figure 4

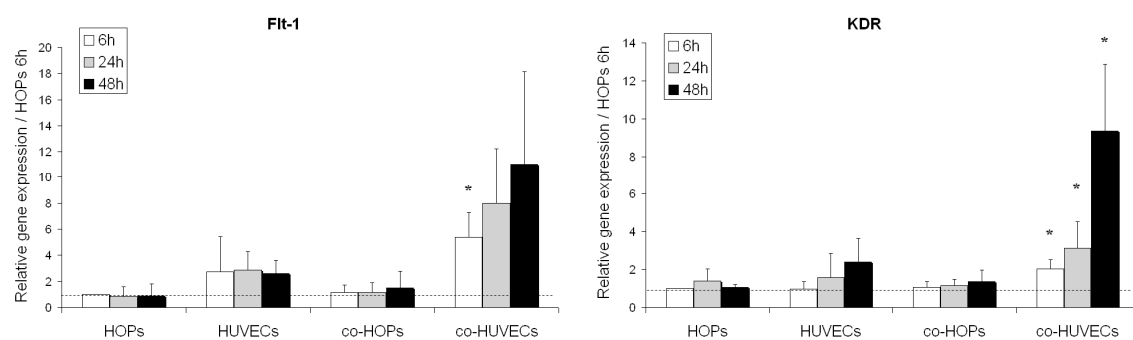
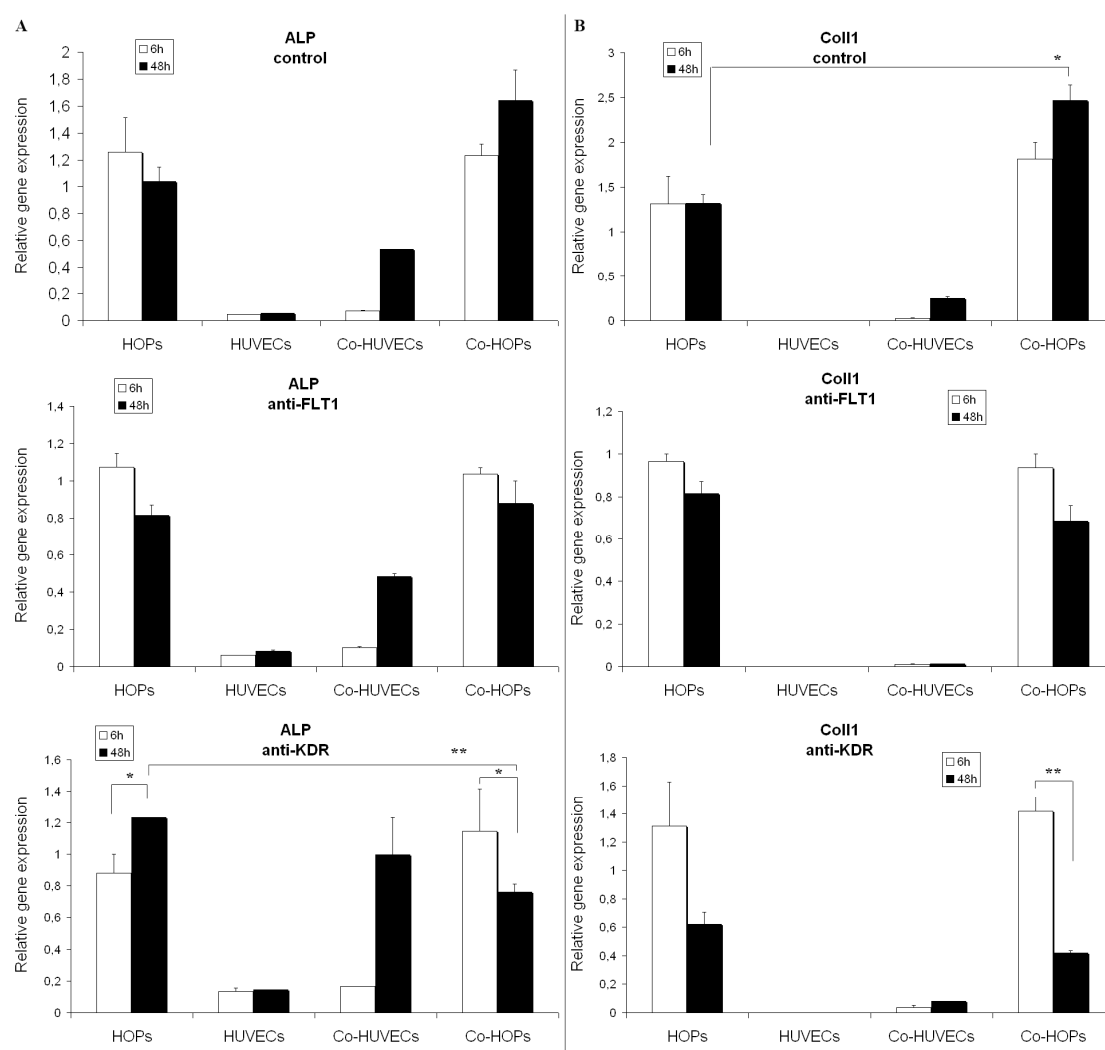


Figure 5



C. Conclusions

Les travaux précédents réalisés laboratoire ont démontré que la co-culture HOPs / HUVECs induisait une régulation du phénotype ostéoblastique [Guillotin et al., 2004; Villars et al., 2000; Villars et al., 2002]. Cependant, il existe également un réarrangement cellulaire induisant la formation de réseaux ressemblants à la formation de capillaires. Ce réarrangement cellulaire a été observé uniquement lorsque les cellules ostéoprogénitrices sont en co-culture avec des cellules de type endothélial (progéniteurs endothéliaux, cellules endothéliales issues de veine saphène ou HUVECs) [Guillotin et al., 2004; Unger et al., 2007; Xin et al., 2001]. Aucune formation de réseaux cellulaire n'apparaît lorsque les ostéoprogéniteurs sont en co-culture en contact direct avec des fibroblastes. Ces résultats suggèrent que la réorganisation cellulaire observée dans notre système de co-culture est spécifique des cellules endothéliales. Cette réorganisation cellulaire est probablement due à la migration de l'un ou de l'autre type de cellules. L'analyse par vidéo-microscopie en temps réel suggère que ce sont les cellules endothéliales qui migrent le long des ostéoprogéniteurs.

La migration cellulaire peut être régulée par la présence de facteurs solubles qui peuvent agir de manière autocrine et/ou paracrine. Dans ce travail, nous avons observé que les cellules endothéliales étaient capables d'induire une réorganisation cellulaire en présence des facteurs sécrétés uniquement par la co-culture. Les milieux issus de ces co-cultures n'induisent aucune formation de réseau tubulaire dans les HOPs et les facteurs solubles sécrétés par les cellules cultivées seules n'ont donné lieu à aucune réorganisation cellulaire des HUVECs. Ces résultats montrent que les HUVECs sont à l'origine de la migration cellulaire et que cette migration est spécifique des facteurs solubles produits uniquement par la co-culture.

La migration des cellules endothéliales est un mécanisme important dans le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins et le VEGF₁₆₅, est un facteur clé dans l'induction de l'angiogenèse. Les ostéoprogéniteurs expriment le gène codant pour le VEGF₁₆₅ et son expression est stimulée lorsque les HOPs sont en co-culture. Néanmoins, la présence de la protéine dans les surnageants de culture n'a été détectée que dans le milieu de culture des HOPs. Plusieurs hypothèses ont alors été avancées pour expliquer l'absence du VEGF₁₆₅ dans le surnageant de co-culture alors que le taux en ARNm est augmenté : soit la protéine de VEGF₁₆₅ est dégradée, soit elle est libérée mais liée à la matrice extracellulaire, soit elle est utilisée par les cellules. Les résultats donnés par la co-culture entre les HOPs et les fibroblastes suggèrent que le VEGF₁₆₅ sécrété par les HOPs serait très probablement utilisé par les cellules de la co-culture HOPs / HUVECs [Clarkin et al., 2007; Gerhardt et al., 2003].

De plus, l'expression des récepteurs au VEGF₁₆₅, analysée par PCR quantitative en temps réel, est stimulée dans les HUVECs lorsque les cellules sont co-cultivées avec les HOPs. Ceci appuie l'hypothèse selon laquelle le VEGF₁₆₅ produit par les cellules ostéoprogénitrices activerait une signalisation intracellulaire dans les cellules endothéliales en co-culture directe.

Afin de déterminer le rôle exact du VEGF₁₆₅ dans cette co-culture, les récepteurs 1 et 2 au VEGF ont été inhibés par des anticorps bloquants spécifiques. Malgré l'inhibition des récepteurs au VEGF₁₆₅, nous pouvons observer le même type de réorganisation cellulaire

qu'en co-culture contrôle. Le VEGF₁₆₅ seul ne semble pas être suffisant pour stimuler la formation de réseaux ressemblant à des capillaires, une association avec d'autres facteurs chémoattractants qu'il y aura lieu d'identifier (bFGF, IGF, TGFβ1...) sécrétés en co-culture pourraient induire ce réarrangement cellulaire. Cependant, l'étude de la régulation du phénotype ostéoblastique montre que l'augmentation de la PAL et du Collagène de type I observée dans la co-culture directe est abolie lorsque les récepteurs au VEGF sont inhibés.

Ainsi, si la co-culture entre les ostéoprogéniteurs et les cellules endothéliales stimule le phénotype ostéoblastique par la régulation de protéines spécifiques, cette co-culture modifie également la fonction endothéliale au moins par la formation de réseaux proches de capillaires, consécutif à une migration des cellules endothéliales. Les perspectives de ce travail seront d'identifier l'origine de ces événements.

La migration cellulaire est un mécanisme complexe faisant intervenir une cascade de processus hautement régulés. Parmi ces régulations, trois mécanismes sont importants : l'influence des facteurs solubles ici étudiés, les jonctions intercellulaires et le remodelage de la matrice extracellulaire.

Compte tenu que la formation de réseaux spécifiques n'a lieu qu'en présence des facteurs sécrétés par les cellules en co-culture uniquement, le contact entre cellules semble important pour permettre la synthèse des acteurs impliqués dans ces processus. Il a déjà été démontré que les cellules peuvent former des jonctions communicantes constituées de connexines 43 en co-culture et ces jonctions pourraient jouer un rôle dans la régulation de la libération des facteurs paracrines, notamment du VEGF [Suarez and Ballmer-Hofer, 2001; Villars et al., 2002; Walker et al., 2005]. Les seconds messagers qui transiteraient au travers de ces pores et qui seraient responsables de ces événements restent à élucider.

Néanmoins, les jonctions adhérentes formées par les cadhérines pourraient aussi intervenir, toujours en association avec la communication paracrine [Carmeliet and Collen, 2000; Lampugnani et al., 2006]. Des résultats préliminaires ont montré que l'expression du CD31 et de la VE-Cadhérine, protéines spécifiques des jonctions adhérentes entre cellules endothéliales sont également régulées en co-culture. De la même façon, la β-caténine, protéine associée aux cadhérines lors de la formation de jonctions adhérentes est régulée en co-culture (Figure 47).

Cette protéine intermédiaire a tout d'abord été analysée par Western Blot dans chaque type cellulaire : HOPs, HUVECs, Co-HOPs et Co-HUVECs (Figure 47 A). La β-caténine reste constante dans les deux types cellulaires cultivés isolément et diminue dans les Co-HOPs et Co-HUVECs. Cependant, la localisation de cette protéine est primordiale afin de déterminer son rôle exact. La β-caténine peut être nucléaire et impliquée dans la différenciation ostéoblastique, peut être membranaire et liée aux jonctions adhérentes ou enfin, cytoplasmique et soumise à la dégradation par le système protéosomique. Les images d'immunofluorescence révèlent que la β-caténine est présente dans le cytoplasme des HOPs et à la membrane des HUVECs de 6h à 48h de culture (Figure 47 B). Néanmoins, la localisation de cette protéine se révèle être de plus en plus membranaire avec le temps dans les co-cultures HOPs / HUVECs suggérant une augmentation des jonctions adhérentes en co-culture. Ces données demandent à être confirmées et pourraient offrir de nouvelles perspectives d'étude de la relation ostéo-endothéliale.

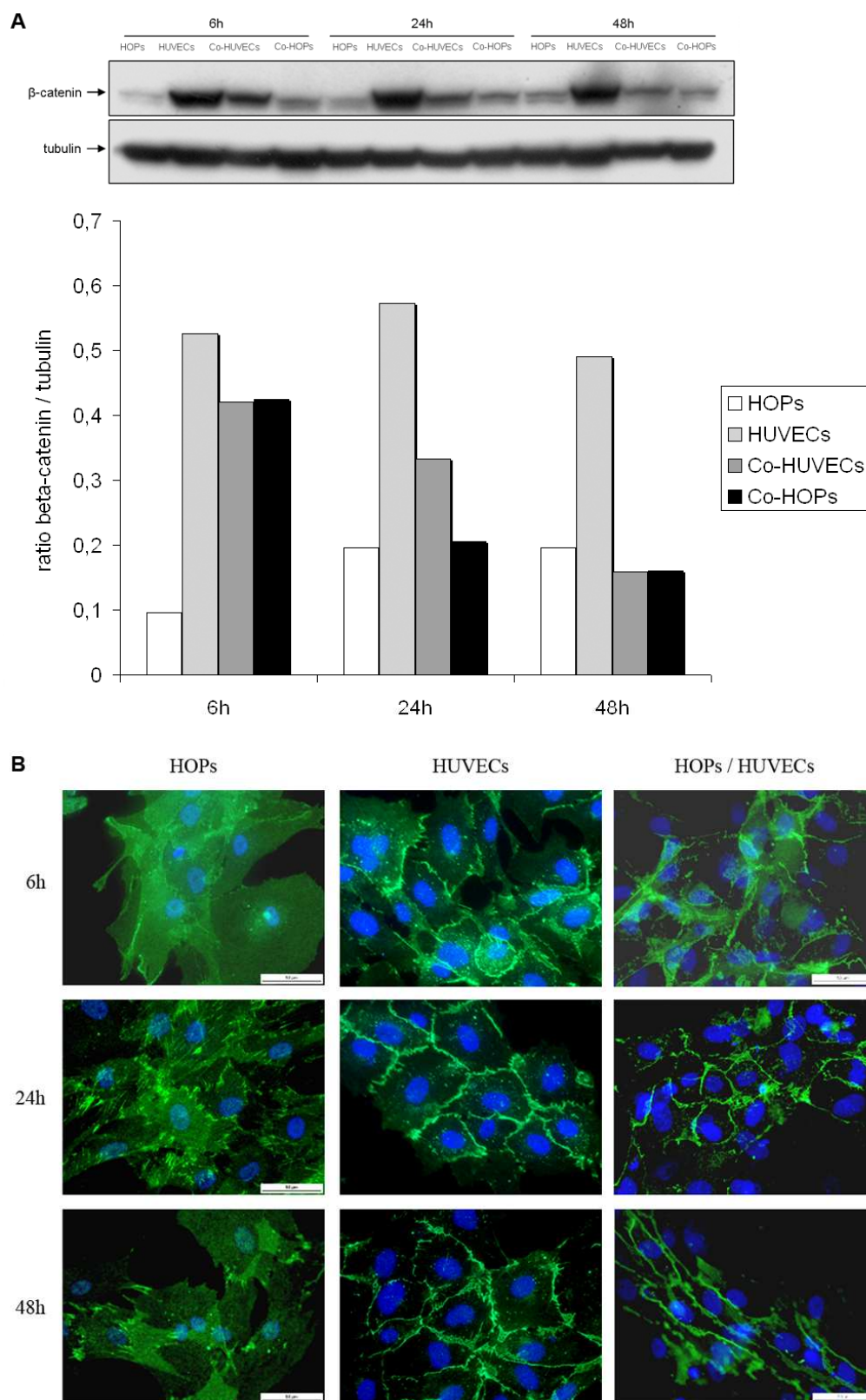


Figure 47. Régulation de la β -caténine en co-culture HOPs/HUVECs.

A : Etude par Western Blot de la quantité de β -caténine. B : Localisation de la β -caténine visualisée par immunofluorescence. Les matériels et méthodes utilisés sont décrits dans l'annexe 1.

En ce qui concerne un éventuel remodelage de la matrice extracellulaire qui pourrait expliquer ces mécanismes de migration et de réarrangement cellulaire, des travaux ont été initiés sur le rôle des protéines impliquées dans la balance de dégradation / synthèse de la matrice extracellulaire telles que les MMPs et TIMPs. L'analyse de leur expression par PCR quantitative montre une régulation des MMPs et des TIMPs en faveur d'une synthèse de matrice dans la co-culture HOPs / HUVECs (Figure 48). L'expression génique de la MMP-1 exprimée majoritairement par les cellules endothéliales diminue lorsque les cellules sont en co-culture (Figure 48 A et B). Son inhibiteur TIMP-1 est également régulé lorsque les cellules sont en co-culture : le niveau en ARNm augmente dans les Co-HOPs comparés aux cultures isolées (Figure 48 C et D). De même, la MMP-13, exprimée par les HOPs diminue en co-culture (Figure 48 E et F).

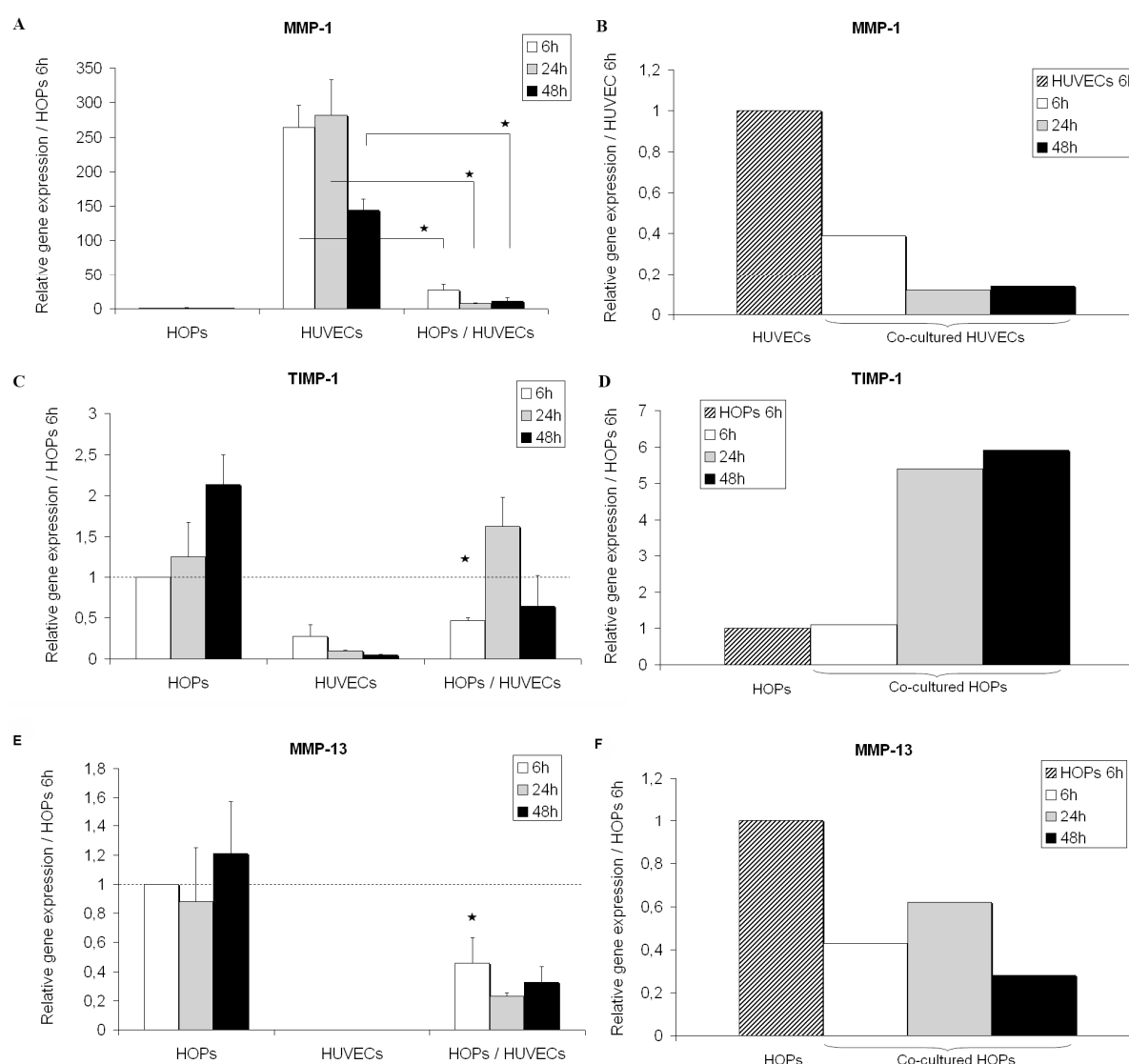


Figure 48. Régulation des gènes codant pour des protéines impliquées dans la balance synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire en co-culture HOPs/HUVECs.

Expression génique des MMP1, TIMP1 et MMP13, évaluée par PCR quantitative. Les matériels et méthodes utilisées sont décrits dans l'annexe 1.

Cependant, le taux en ARNm ne prédit pas de la quantité en protéine exprimée par les cellules. L'activité enzymatique d'une des métalloprotéases, la MMP-13, a été quantifiée par un test ELISA et les résultats révèlent que cette activité ne varie ni selon le temps, ni selon le type cellulaire. La mesure de l'activité de ces MMPs par zymographie constitue une des perspectives de ce travail.

Enfin, le remodelage de la MEC est également régulé par des facteurs exprimés majoritairement par les cellules endothéliales et impliqués dans la cascade de coagulation. Jouant un rôle dans la régulation de la formation ou de la dégradation du caillot de fibrine, ces facteurs ont également une fonction essentielle sur le remodelage de la MEC. Nos travaux préliminaires ont montré en particulier que la co-culture HOPs / HUVECs entraînerait une régulation du vWF, du facteur tissulaire, du tPA (Activateur de plasminogène tissulaire) et du PAI-1 (son inhibiteur) (Figure 49). En effet, le vWF exprimé uniquement par les cellules endothéliales diminue lorsque les cellules sont en co-culture (Figure 49 A). Le FT et le tPA diminuent significativement lorsque les cellules sont en cultures isolées alors qu'il est stable (FT) ou augmente (tPA) en co-culture (Figure 49 B et C). Le PAI-1 exprimé majoritairement par les HUVECs augmente en fonction du temps en culture isolée et en co-culture (Figure 49 D).

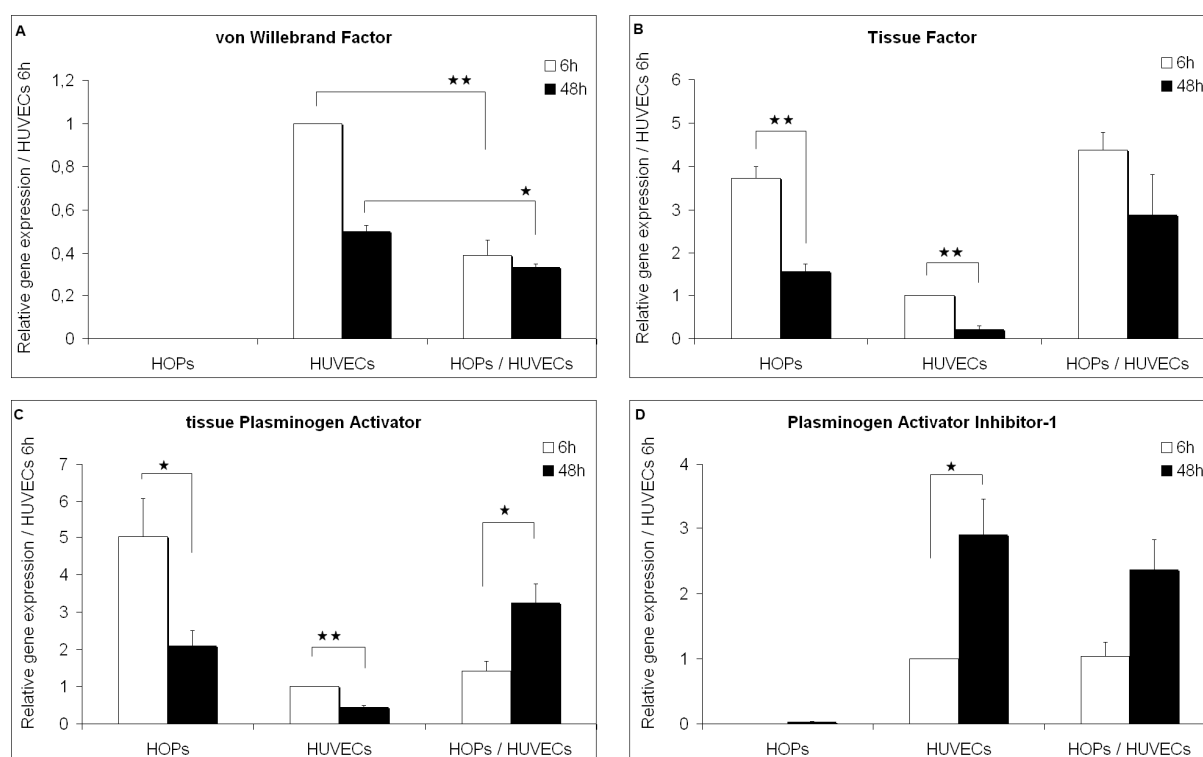


Figure 49. Régulation des gènes codant pour des protéines de coagulation impliquées dans le remodelage matriciel.

Expression génique des vWF, Facteur tissulaire (tissue Factor), activateur du plasminogène tissulaire (tissue activator plasminogen) et de son inhibiteur (plasminogen activator inhibitor-1), évaluée par PCR quantitative. Les matériels et méthodes utilisés sont décrits dans l'annexe 1.

Ces résultats préliminaires suggèrent que les cellules en co-culture sont capables de réguler leurs phénotypes respectifs et participeraient à l'organisation d'une matrice extracellulaire remodelée grâce à l'activité de multiples facteurs, sécrétés ou membranaires.

En conclusion, l'ensemble de ces données montrent que la communication entre les ostéoprogéniteurs et les cellules endothéliales fait intervenir d'autres voies de communication que les jonctions communicantes de type gap. Le rôle des facteurs paracrines, des jonctions adhérentes, des protéines de la MEC et des facteurs associés à son remodelage sont autant de voies qu'il reste à explorer pour mieux comprendre la relation entre l'ostéogenèse et la vascularisation.

III. La communication ostéo-endothéliale dans une matrice tridimensionnelle

A. Introduction

Les travaux précédents ont mis en évidence que la co-culture entre les HOPs et les HUVECs pouvait favoriser le potentiel ostéogénique des HOPs et angiogène des HUVECs. Dès lors il est envisageable d'utiliser cette co-culture pour le développement d'une nouvelle stratégie de réparation du tissu osseux. L'objectif ici est d'associer cette co-culture à une structure tridimensionnelle de type polymère afin d'étudier *in vitro* le comportement de ces cellules dans un tel système et de pouvoir implanter cette matrice 3D cellularisée *in vivo*, dans une lésion osseuse chez le petit animal : la souris *nude*. Les polymères naturels font l'objet d'un intérêt croissant dans le domaine de la recherche en ingénierie tissulaire car ils sont biocompatibles, non cytotoxiques, biodégradables et déjà utilisés en clinique pour la libération de facteurs tels que des facteurs de croissance.

Pour cette étude, nous avons choisi d'encapsuler les deux types cellulaires dans des microsphères d'alginate. L'alginate est un polysaccharide composé de monomères d'acide guluronique ou mannuronique, et qui a la capacité de former un gel au contact de cations divalents tels que le calcium (Figure 50 A et D). De plus, l'alginate permet de créer des microsphères de petite taille capables de véhiculer des cellules et qui peuvent alors constituer un système injectable permettant de limiter les interventions chirurgicales lourdes. Cependant, ce polymère a une cinétique de dégradation beaucoup plus lente que la cinétique de néo-formation osseuse. Dans ce travail, l'alginate a donc été irradié puis oxydé afin d'accélérer sa dégradation naturelle, ceci n'altérant en rien ses autres propriétés (Figure 50B). D'autre part, l'alginate ne favorisant pas l'adhésion cellulaire, un peptide contenant une séquence RGD a été greffé de façon covalente afin d'augmenter le potentiel adhérent de l'alginate (Figure 50 C).

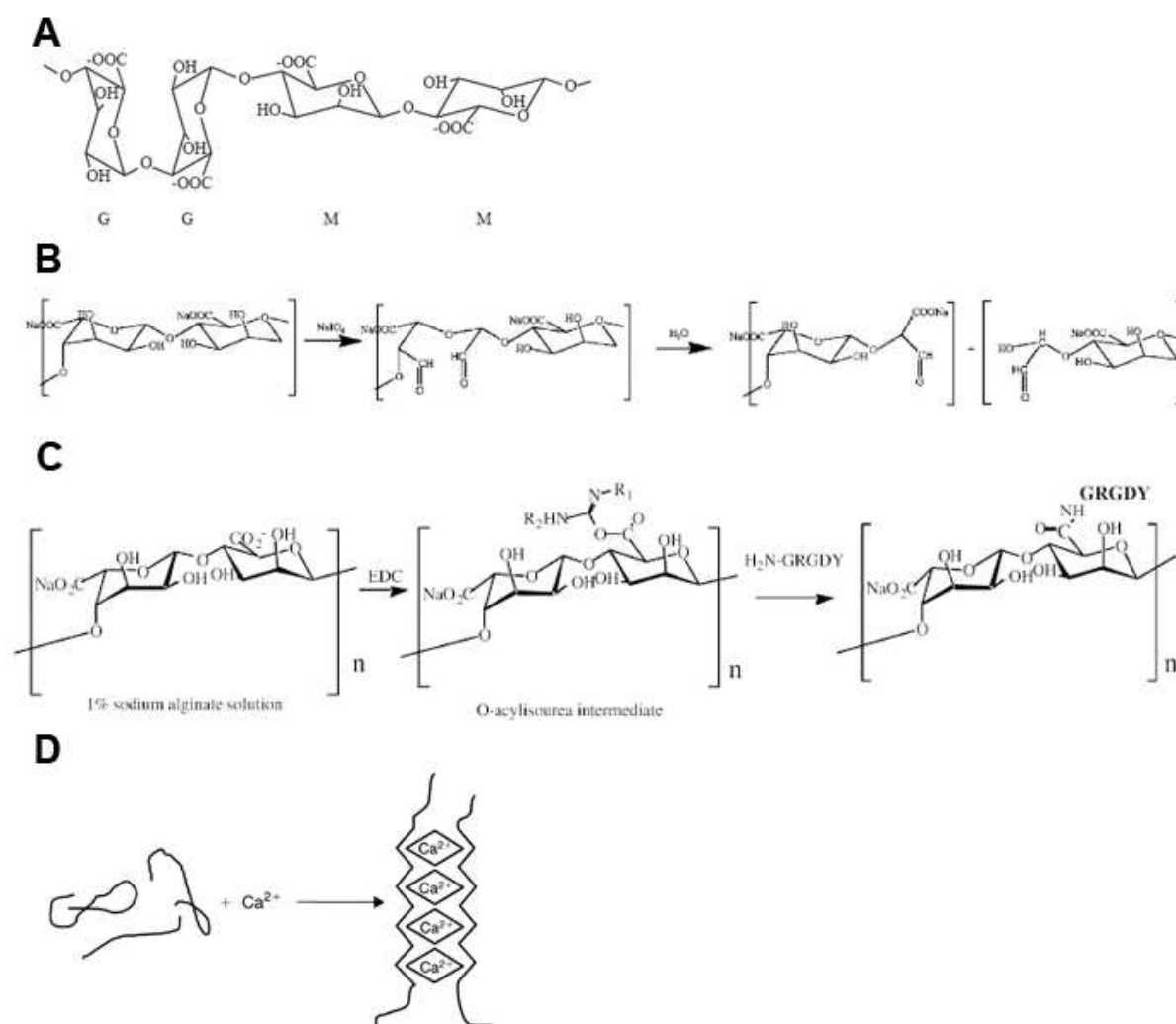


Figure 50. Modifications chimiques apportées à l'alginate et gélification, [Boontheekul et al., 2005; Drury et al., 2004; Rowley et al., 1999].

L'alginate est composé de monomères G (acide guluronique) qui déterminent les propriétés de viscosité lors de sa gélification au contact du calcium et de monomères M (acide mannuronique) (A). L'oxydation de l'alginate par le periodate de sodium permet l'ouverture d'une chaîne qui va favoriser le clivage des monomères par hydrolyse (B). Le greffage d'une séquence contenant un peptide RGD est permis grâce à l'intermédiaire du carbodiimide EDC qui facilite l'établissement de la liaison peptidique entre l'alginate et le groupe amine-terminal de la séquence peptidique (C). Dans notre cas, la séquence peptidique était G₄RGDSP : (Gly)₄-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro. La gélification de l'alginate se réalise entre deux chaînes polymériques par liaison au calcium (D).

Dans un premier temps, les phénotypes ostéoblastique et endothélial ont été analysés après culture *in vitro* des microsphères en bioréacteur. Puis, ces microsphères cellularisées ont été implantées *in vivo* chez la souris en site osseux afin d'étudier le potentiel ostéogénique de ce système tridimensionnel.

En ce qui concerne le choix du modèle animal, l'implantation des biomatériaux de substitut osseux chez le gros animal tel que le porc présente deux avantages majeurs. Premièrement, ils permettent de réaliser des lésions osseuses de taille critique, c'est-à-dire qui ne se réparent pas naturellement, et qui favorisent l'étude de la formation osseuse induite par le

biomatériau implanté. Deuxièmement, les modèles de gros animaux sont plus proches de l'Homme. Par contre, le nombre d'expérimentation reste limité par le coût de l'animal lui-même et par l'infrastructure nécessaire pour mener à bien ces expérimentations.

Les modèles de petits animaux tels que les Rats ou les Souris permettent l'utilisation de techniques d'imagerie de haute résolution (comme l'Imagerie par Résonnance Magnétique ou l'analyse par tomographie aux rayons X) pour certaines non-invasives permettrait ainsi de réduire le nombre d'animaux à utiliser. Les modèles de lésion osseuse de taille critique chez le Rat existent mais le Rat est un animal qui a tendance à réparer rapidement ses tissus comparativement à la Souris.

Le site d'implantation du matériau de substitution osseuse joue également un rôle important. Les implantations réalisées en sous-cutané permettent d'étudier le potentiel ostéoinducteur de l'implant alors que le site osseux donne une information sur le potentiel ostéoconducteur de l'implant. Parmi les sites osseux, deux emplacements sont privilégiés : l'implantation au niveau des os longs, tels que le fémur ou le tibia où les contraintes mécaniques sont intenses ; et l'implantation dans la calvaria, au niveau du crâne où les contraintes mécaniques sont inexistantes.

Au sein du laboratoire, plusieurs modèles expérimentaux chez la souris ont été développés, appliqués d'une part à des modèles de génétique expérimentale et d'autre part à des souris immunodéficientes (*nude*) afin de permettre l'implantation de cellules humaines :

- un modèle de lésion corticale pratiquée dans la diaphyse fémorale,
- un modèle de lésion cortico-spongieuse pratiquée au niveau de la plaque de croissance fémorale,
- un modèle de perforation au niveau de la calvaria de souris.

Dans ce travail, les microsphères d'alginate ont été implantées chez la souris *nude* dans un défaut osseux (0,9mm de diamètre) réalisé au niveau de la plaque de croissance fémorale.

Le but du travail présenté ci-après a été d'analyser *in vitro* le phénotype ostéoblastique et endothélial des cellules en co-culture dans un système en 3D dans des microsphères d'alginate cultivées en conditions dynamiques puis *in vivo* au sein d'un défaut osseux réalisé chez la souris *nude*.

B. Article

Biomaterials

**Co-Immobilization of Human Osteoprogenitors and Endothelial Cells within Alginate
Microspheres Enhances Mineralization in Bone Defect**

Grellier M.^{1,2,*}, Fricain J-C.¹, Granja P.L.², Bidarra S.J.², Renard M.³, Amédée J.¹, Barbosa
M.A.²

¹INSERM, U577, Bordeaux and Université Victor Segalen Bordeaux 2, UMR-S577,
Bordeaux, F-33076, France

²INEB - Instituto de Engenharia Biomédica, Divisão de Biomateriais, Rua do Campo Alegre,
823, 4150-180 Porto, Portugal

³ CIC-IT Biomatériaux INSERM/CHU de Bordeaux, Centre d'Investigation Clinique -
Innovation Technologique Biomatériaux, PTIB - Hôpital Xavier Arnoz, Avenue du
Haut Lévêque, 33600 Pessac – France

Soumis

Abstract

Alginate is a natural polymer widely used as biomaterial which allows cell encapsulation. Bone remodelling is dependant on cell communication between osteogenic and endothelial cells arising from surrounding blood vessels. This study aims to determine if endothelial cells can regulate osteogenic potential of osteoprogenitor cells *in vitro* and *in vivo*, in a long bone defect, when co-immobilized in alginate microspheres. Human osteoprogenitors (HOPs) arising from bone marrow mesenchymal stem cells were immobilized alone or together with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Immobilized cells were cultured in dynamic conditions and cell metabolic activity increased during the three weeks study period. The gene expression of alkaline phosphatase and osteocalcin, both specific of osteoblastic phenotype, and mineralization deposits were upregulated in co-immobilized HOPs and HUVECs. VEGF secretion increased when HOPs were co-immobilized with HUVECs. Microspheres containing co-cultures were further implanted in a bone defect and bone formation was analysed by μ CT and histology at 3 and 6 weeks post-implantation. The immobilized cells enhanced mineralization inside and around the implanted microspheres. Furthermore, when HOPs were co-immobilized with HUVECs, mineralization significantly increased. These findings demonstrated that co-immobilization of osteogenic and endothelial cells within alginate microspheres provides a promising strategy for bone tissue engineering.

Keywords

Osteoprogenitor, endothelial cells, co-cultures, alginate, cell immobilization, tissue engineering

1. Introduction

Current procedures to repair bone defects and to provide it with structural and mechanical support include the use of grafts (autologous, allogenic or xenogenic) or implants (ceramic, polymeric or metallic). These approaches face significant limitations due to insufficient supply, potential disease transmission, rejection, cost, inability to integrate with the surrounding host tissue and several associated surgical complications [Oreffo and Triffitt, 1999]. Tissue engineering of bone offers new therapeutic strategies to aid musculoskeletal healing, through the combination of scaffold structures combined with cells and/or bioactive molecules.

Scaffold materials are a fundamental component of tissue engineering strategies. A variety of porous scaffold polymers have shown promising potential for bone tissue engineering applications. Crescent interest has been drawn to natural polymers mainly because they are biodegradable and biocompatible, and often allow cells to adhere, proliferate and differentiate without the problems of inflammatory reactions and cytotoxicity, which are often associated with synthetic polymers [Lubiatowski et al., 2006].

Cells are also of key importance in tissue engineering strategies to provide specific metabolic activity in the fracture site [Evangelista et al., 2007]. Mesenchymal stem cells (MSCs) are among the cell sources able to differentiate in osteoblasts and to afford osteogenic potential for bone repair. Furthermore, it seems to be now well established that bone remodelling is dependant on cooperative interactions, both physical and biochemical, between vascular endothelial cells (ECs) and osteoblasts [Carano and Filvaroff, 2003; Deckers et al., 2000; Gerber and Ferrara, 2000]. In previous studies, the present team demonstrated that osteoprogenitor cells were able to secrete vascular endothelial growth factor (VEGF) and to early differentiate when co-cultured with ECs *in vitro* [Guillotin et al., 2004; Villars et al., 2000]. Association of ECs with osteogenic cells was also performed for the *in vivo*

assessment of the osteoinductive potential of these implanted cells [Kaigler et al., 2006a; Sun et al., 2007]. However, new improved scaffolds are necessary, providing alternative surgical procedures for their implantation.

Alginate hydrogels have been shown to have a wide applicability as biomaterials [Augst et al., 2006]. Alginates are polysaccharides isolated from brown algae such as *Lessonia flavicans*, *Desmarestia ligulata* or *Desmarestia distans*, found in coastal waters around the globe [Leal et al., 2008]. Modified alginates have been proposed for applications as varied as drug delivery vehicles for proteins promoting regeneration of mineralized tissues or carrier for transplanted cells [Abbah et al., 2006; Alsberg et al., 2001; Barrias et al., 2005; Keshaw et al., 2005]. A critical advantage in the use of alginate is related with its gentle gelling behaviour, which allows encapsulation of various bioactive molecules or cells. Cell immobilization within microspheres constitutes an innovative injectable system for regenerative purposes, facilitating the use of minimally invasive surgical techniques. Furthermore, immobilization of cells within alginate microspheres offers additional attractive features for tissue engineering, including ease of handling and the formation of a highly hydrated tissue-like environment, fundamental for cells and tissues to form *in vivo*.

The aim of this study is to determine if ECs can regulate the osteogenic potential of osteoprogenitor cells *in vitro* and *in vivo*, in a mice bone defect, when co-immobilized inside modified alginate microspheres. For this purpose, alginate was irradiated and oxidized to promote its degradation and grafted with a peptide containing the RGD sequence, to promote cell adhesion [Durrieu et al., 2004; Kong et al., 2003]. Human osteoprogenitor cells from bone marrow (MSCs) were immobilized alone or co-immobilized with ECs within RGD-alginate microspheres. Cells were analysed for their metabolic activity, their ability to express specific markers of both phenotypes and their capability to secrete VEGF₁₆₅. Microspheres containing cells were implanted in a bone defect in the femoral metaphysis of *nude* mice.

Mineralization and new bone formation were analysed by X-Ray micro-Computer Tomography and histology at 3 and 6 weeks post-implantation. The orthotopic environment used here for implantation provides a clinically relevant environment.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

After informed consent was obtained, human bone marrow was obtained by aspiration from the femoral diaphysis or iliac bone from patients (aged 20-70years) undergoing hip prosthesis surgery after trauma. Cells were separated into a single suspension by sequential passage through syringes fitted with 16-, 18-, and 21-gauge needles. The cells were then counted and plated at 10^5 cells/cm² in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco) supplemented with 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS), and incubated in a humidified atmosphere containing 5% (v/v) CO₂ at 37 °C. Dexamethasone at 10^{-8} M was added into the culture medium for the first two weeks of culture to induce osteoblastic differentiation of adherent cells [Villars et al., 2000]. They express Cbfa1/Runx2, ALP and type I collagen but do not express osteocalcin which is a late marker.

Endothelial cells (ECs) were isolated from Human umbilical cord vein essentially as described by Bordenave *et al.* [Bordenave et al., 1993] after the procedure of Jaffe et al. [Jaffe, 1980]. These cells were cultured in IMDM supplemented with 20% (v/v) FBS, 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 0.4% (v/v) Endothelial Cell Growth Supplement / Heparin kit (PromoCell).

Human osteoprogenitors (HOPs) arising from the second subculture were co-cultured with Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in IMDM containing 10% (v/v) FBS

without growth factors. HOPs were co-cultured at 1:2 ratio with HUVECs while HOPs and HUVECs isolated cultures were used as controls.

2.2. Alginate modification

Alginate modification was carried out according to the procedure previously described by Evangelista et al. [Evangelista et al., 2007], which was adapted from Rowley and Mooney [Rowley and Mooney, 2002]. Protanal LF 20/40 sodium alginate, with a high content of guluronic acid units, from FMC Biopolymers, was used as high molecular weight (high MW) component to prepare alginate microspheres (M_n 218,900 g/mol; M_w 251,000 g/mol). Briefly, the low molecular weight (low MW) alginate was obtained using γ -irradiation with a cobalt-60 source at a dose of 5 MRad, as previously described by Kong et al. [Kong et al., 2003]. Before any chemical modification, the polymer was purified through dialysis against deionized water for 3 days using a MWCO 3500 membrane (Spectra/Pors), followed by stirring of the solution with 0.5 g of activated charcoal (Fisher) per gram of alginate. Later, the solution was filtered and lyophilized before further modifications. Oxidation of the sodium alginate polymer was carried out using sodium periodate. Oligopeptides with a sequence of (Glycine)₄-Arginine-Glycine-Aspartic-Acid-Serine-Proline (abbreviated as G₄RGDSP, Commonwealth Biotechnologies, Inc., Richmond, VA, USA) were covalently grafted to the oxidized alginate using the aqueous carbodimide chemistry. For this purpose, 16.7 mg of peptide were used per gram of alginate polymer, which corresponds to two peptides per alginate polymer chain for high MW alginate. After reaction for 24h the alginate was purified by dialysis using a MWCO 3500 (Spectra/Pors), and then filtered, lyophilized and stored at -80°C until further use.

The composition selected to immobilize cells was RGD-modified alginate corresponding to a 2% (w/v) alginate solution in 0.9% NaCl (Sigma). It was composed of a 50:50 mixture of

oxidized and RGD-modified alginate (25% high MW, 75% low MW) and unmodified high MW purified alginate.

2.3. Cell immobilization and culture within alginate microspheres

Three types of test conditions were used, consisting in microspheres with: HUVECs, HOPs, or co-cultures of HOPs and HUVECs at a 1:2 ratio. Microspheres without cells were used as control. HOPs and HUVECs were cultured separately in 300 cm² flasks until 90% confluent, after which they were harvested by trypsin treatment, were re-suspended in 0.9% NaCl and loaded in a 5 mL syringe. The final density of immobilized cells in alginate solution was 20x10⁶ cells/mL. After centrifugation and discarding of the supernatant, cells were carefully homogenized with the sterile 2% (w/v) RGD-modified alginate in 0.9% NaCl solution using a dual-syringe system. Subsequently, the alginate-cell suspension was fed into a bead generator by a syringe pump and beads were produced by an electrostatic bead generator (Nisco). The experimental conditions used to control the diameter of the generated beads were 20 mL/h flow rate of the alginate solution, 10 kV/cm electrostatic potential, 0.25 mm inner diameter needle and 3 cm distance between the gelling bath and the needle tip. The microspheres were allowed to polymerize, under constant stirring, in an isotonic 0.1 M CaCl₂ solution, and were kept therein for 15 min. The microspheres were then rinsed 2 times in Tris Buffer Saline (TBS) followed by 4 rinses in IMDM.

Cells immobilized within alginate microspheres were cultured in dynamic culture conditions for up to 21 days using 100 mL spinner flasks (Bellco Biotechnologies) and culture medium was changed every week.

2.4. Cell metabolic activity

Samples of microspheres of the different conditions tested were recovered at days 1, 8, 15 and 22 post-immobilization and were incubated in 400 μ L of IMDM supplemented with 10% FBS in a 24-well plate. To each well, 80 μ L of MTS solution (Promega) were added. The microspheres were incubated for 3h at 37°C, after which 100 μ L/well were transferred to a 96-well plate and absorbance was measured at 490 nm with reference to 620 nm in a plate reader (SLT, Spectra).

2.5. Quantitative real time polymerase chain reaction (Q-PCR)

After 1, 8, 15 and 22 days of *in vitro* culture, samples of microspheres were collected and incubated with EDTA (50 mM) for 10 minutes to dissolve alginate. Cells were then washed in PBS by centrifugation. Total RNA were extracted using the RNeasy™ Total RNA kit (QIAGEN) and 1 μ g was used as template for single strand cDNA synthesis with the Superscript preamplification system (Gibco) in a 20 μ l final volume containing 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mg/mL BSA, 10 mM DTT, 0.5 mM of each dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.5 μ g oligo(dT)₁₂₋₁₈, and 200 U of reverse transcriptase. After incubation at 42°C for 50 min, the reaction was stopped at 70°C for 15 min.

Five microlitres of cDNA diluted at a 1:80 ratio were loaded in a 96 wells plate. SYBR-Green Supermix® (2X iQ™, BioRad) was added to the final concentration of 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 0.2 mM of each dNTP, 25 units/mL iTaq™ DNA polymerase, 3 mM MgCl₂, SYBR™ Green I, 10 nM fluorescein, and stabilized in sterile distilled water. Primers of ubiquitary ribosomic protein P0 (forward: 5' ATGCCAGGGAAGACAGGGC 3' – reverse: 5' CCATCAGCACACAGCCTTC 3'), von Willebrand Factor (vWF) (forward: 5'CCCCTGAAGCCCCTCCTCCTA 3' – reverse: 5' ACGAACGCCACATCCAGAACC 3'), Alkaline Phosphatase (ALP) (forward: 5' AGCCCTTCACTGCCATCCTGT 3' – reverse: 5'

ATTCTCTCGTTCACCGCCCAC 3'), osteocalcin (OC) (forward: 5' ACCACATCGGCTTTC AGGAGG 3' – reverse: 5' GGGCAAGGGCAAGGGGAAGAG 3') and VEGF₁₆₅ (forward: 5' GATGCGATGCGGGGGCTGCTG 3' – reverse: 5' TCTTGCTCTATCTTTCTTTGG 3') were used at the final concentration of 200 nM. Data were analyzed with the iCycler IQ™ software, and compared by the $\Delta\Delta C_t$ method. Each Q-PCR was performed in triplicate for PCR yield validation. Results were expressed relatively to gene expression level of day1 post-immobilization, which was standardized to 1. Significance was calculated by student's *t* test (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

2.6. Quantification of soluble vascular endothelial growth factor (VEGF)

Samples of culture supernatants were taken every week and centrifuged for 5 minutes at 300g to separate cells. VEGF levels released by the immobilized cells were measured using the commercially VEGF ELISA kit (R&D systems). The VEGF concentration in the supernatants was normalized by the number of HOPs in the microspheres and expressed in pg per HOP ($\times 10^3$). At days 1, 8, 15 and 22, microspheres were recovered for different analyses. The number of recovered cells were counted and subtracted to the number of the precedent time point. For immobilised co-culture, the same method was applied. Since HUVECs do not express VEGF [Villars et al., 2000], the VEGF concentration was expressed in pg per HOP assuming that there was 1 HOP for 2 HUVECs in the co-cultures (ratio used in the microspheres). Significance was calculated by student's *t* test (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

2.7. Von Kossa staining

Microspheres at different time points of culture (1, 8, 15 and 22) were recovered from dynamic culture conditions and washed with TBS. Afterwards, they were fixed in 4% paraformaldehyde/TBS for 10 min. Dehydration in a gradient series of ethanol was performed

and microspheres were embedded in paraffin blocks. Sections of 8 μm thickness were sequentially recovered, dewaxed in xylene and rehydrated in a decreasing gradient series of ethanol followed by water. Von Kossa staining of the sections was performed incubating them in 2.5% (w/v) silver nitrate for 30 min, followed by incubation in water for 10 min and, finally, in 5% (w/v) formol sodium carbonate for 3 min.

2.8. Surgical procedure

Treatment of experimental animals was in accordance with the European animal care guidelines 86/609/CEE. Thirty-one nude mice aged 10 weeks, with an average weight of 23 g were used. The animals were housed in cages, in a sterile animal house, with free access to food and water. Animals were anesthetized using intraperitoneal injection of ketamine (75 mg/Kg body weight) and Medetomidine (100 ng/Kg body weight). Bilateral incisions were made over the length of the femur and bone perforations of 0.9 mm diameter were carried out using an electric drill in metaphysis site. Defects created received one of the following three types of microspheres: without cells, with HOPs or with HOPs and HUVECs. Mice were given 0.05 mg/Kg buprenorphine subcutaneously every 12h for the first 48h after the surgery. Animals were sacrificed by a lethal intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (20%) at 3 and 6 weeks post implantation and bones were fixed in 4% paraformaldehyde for 72h at 4°C, then transferred into 70% ethanol and stored at 4°C.

2.9. X-rays micro computer tomography (μCT)

Femurs were scanned in an Explore Locus SP X-Rays microcomputerized tomography device (General Electric) at an isotropic resolution of 8 μm . Reconstruction of the metaphyseal region was performed following correction of rotation centre and calibration of mineral density.

2.10. Histological analyses

Femurs were embedded in methyl-metacrylate, 9µm thick sections were cut and mineralization was revealed by Von Kossa staining, as previously described. Pictures were generated using a Nikon Eclipse80i microscope. Quantification of mineralized area fraction (%) of 5 samples of each condition was performed with ImageJ software. The total microsphere area was selected and the percentage of mineralized fraction of this total area was calculated by the software. Significance was calculated by Mann-Whitney's U test (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

3. Results

3.1. Immobilization of cells in alginate microspheres

HUVECs, HOPs and co-culture of HOPs and HUVECs were immobilized in alginate microspheres and the diameter obtained was comprised between 200 µm and 500 µm (Fig. 1). The cell distribution was found to be homogeneous inside microspheres.

Immobilized HOPs and co-immobilized HOPs/HUVECs showed an increasing metabolic activity during the 3 weeks of *in vitro* culture in dynamic conditions (Fig. 2). However, encapsulated HUVECs exerted little or no metabolic activity already after 8 days of *in vitro* culture.

3.2. Phenotype and in vitro osteogenic potential of immobilized cells

One, 8, 15 or 22 days post-immobilization, cells were analysed for their ability to express specific markers of endothelial and osteoblastic phenotypes. HUVECs co-immobilized with HOPs still expressed vWF mRNA after 3 weeks of *in vitro* culture (Fig. 3A). ALP and OC,

both specific markers of the osteoblastic phenotype, were examined in immobilized HOPs and co-immobilized HOPs/HUVECs. ALP, an early marker, was expressed in both types of cultures but co-immobilization significantly enhanced its expression level (Fig. 3B). In the same way, OC, which is a late marker, was expressed by immobilized HOPs and co-immobilized HOPs but in significantly higher amounts in co-immobilization after 22 days of dynamic *in vitro* culture (Fig. 3C). Mineralization was assessed through analysis of calcium phosphates deposition, as determined by Von Kossa staining. When HOPs are embedded in alginate, cells seemed not to produce significant mineralization over time (Fig. 4). However, co-immobilization of HOPs/HUVECs appeared to enhance mineralization in alginate matrix after 22 days in dynamic *in vitro* conditions.

Moreover, VEGF gene expression and protein release were assessed. Immobilized HOPs and co-cultures expressed the VEGF₁₆₅ gene (Fig. 5A). After 15 and 22 days, the VEGF₁₆₅ gene expression was significantly up-regulated in the immobilized co-cultures, comparing to HOPs immobilized alone.

Precedent studies showed that VEGF was expressed by HOPs but not by HUVECs [Villars et al., 2000]. In this work, the amount of VEGF secretion was expressed in pg per HOP in order to analyse the real value of VEGF secretion in the co-culture. VEGF protein was secreted by the immobilized cells and a significant up-regulation was also observed when the HOPs were co-immobilized with HUVECs (Fig. 5B).

3.3. Transplantation of cells inside alginate microspheres for bone tissue regeneration

Three types of alginate beads (without cells, with HOPs, with co-cultures HOPs/HUVECs) were implanted in a bone defect in *nude* mice and bone regeneration was analysed 3 and 6 weeks after implantation. X-rays Computer Tomography results showed that alginate microspheres without cells do not promote significant mineralization even 6 weeks after

implantation (Fig. 5). Immobilized HOPs showed to further mineralize around and inside the microspheres after 3 and 6 weeks, respectively. Finally, implanted co-immobilized HOPs/HUVECs revealed intense mineralization inside the alginate matrix since 3 weeks post-implantation (Fig. 5). Von Kossa staining of the femur sections confirmed the μ CT images (Fig. 6A). No mineralization was observed when the bone defect was filled with alginate beads alone, and only a few mineralization nodules were noticed in the presence of HOPs. However, the co-encapsulation of osteoprogenitors and ECs led to intense mineralization inside the microspheres. The quantification of the mineralized fraction of the total implant area validated the results obtained for μ CT and histological analyses (Fig. 6B). Mineralization induced by alginate associated with cells (HOPs or HOPs/HUVECs) is significantly higher than with alginate alone. The quantification of mineralization by von Kossa staining did not show significant differences between HOPs and HOPs/HUVECs at 3 weeks post-implantation. However, 6 weeks post implantation, co-immobilization of HUVECs and HOPs was associated with a significant increase in mineralization.

4. Discussion

Crescent interest has recently been drawn on cell communication between osteogenic cells and endothelial cells in co-culture and several studies already showed that osteoblastic differentiation is enhanced by endothelial cells in a two-dimension culture system [Clarkin et al., 2007; Guillotin et al., 2004; Villars et al., 2002]. In this study, the osteogenic potential of human osteoprogenitor cells co-immobilized with endothelial cells was assessed inside alginate microspheres. Encapsulation of cells allowed us to study the behaviour of both cell types in a three-dimension system, under dynamic culture conditions, and to investigate for the first time their osteogenic potential in a long bone defect in mice.

Immobilized HUVECs exhibited little or no metabolic activity after a few days of dynamic culture. This result may be related with the requirement of HUVECs to spread in order to grow, migrate, and survive [Cheng et al., 2007], which is challenged when cells are embedded in an hydrogel. In previous work, Evangelista et al. [Evangelista et al., 2007] demonstrated that the cytoskeleton of immobilized bone osteoprogenitors was organized and showed interactions with the RGD-modified alginate matrix. Due to their absence of metabolic activity, the behaviour of immobilized HUVECs was not further investigated. However, the overall metabolic activity of co-immobilized cells increased over time, with HOPs probably promoting HUVECs survival. The up-regulation of VEGF secretion by HOPs co-immobilized with HUVECs could explain this result since this cytokine is widely known to enhance proliferation of endothelial cells [Cross and Claesson-Welsh, 2001; Gerber et al., 1998; Villars et al., 2000].

In previous studies, the present team also demonstrated that osteoprogenitors and ECs in two-dimension static co-cultures regulated osteoblastic differentiation through ALP stimulation [Guillotin et al., 2004; Villars et al., 2000]. However, bone tissue is submitted to mechanical forces such as shear stress induced by fluid movements. Thus, the study of these co-cultures in three-dimensional dynamic conditions was investigated to better mimic conditions found *in vivo*. The gene expression of ALP and OC, both characteristic markers of osteoblastic phenotype, were significantly upregulated in co-immobilized cells. Moreover, the von Kossa staining revealed a more intense mineralization in microspheres containing HOPs and HUVECs. Together, these results showed that the cross-talk between these two cell types is necessary to enhance osteoblastic differentiation. Furthermore, the co-immobilized cells were able to secrete a higher amount of VEGF, that could have a paracrine effect on endothelial cells which, in turn, could secrete osteogenic molecules such as bone morphogenetic protein,

thus promoting the osteoblastic phenotype, as it was already shown by Bouletreau et al. [Bouletreau et al., 2002a].

The present *in vitro* study revealed that the RGD-modified alginate microspheres could enhance mineralization potential of osteoprogenitor cells when co-immobilized with endothelial cells. It has been shown that alginate beads present an interesting strategy for bone tissue engineering as a growth factors delivery system associated with cells or not [Lu et al., 2008; Simmons et al., 2004]. Most of the previous studies tested the osteogenic potential of similar hydrogels in subcutaneous sites or using open structure composite scaffolds, which expose cells to their surrounding environment [Alsberg et al., 2001; Simmons et al., 2004]. As proposed here, alginate microspheres can provide a useful new system for promoting bone regeneration as an injectable cell vehicle. To validate this strategy, it was envisaged to test if alginate microspheres containing cells could support the osteogenic potential of transplanted cells, as already demonstrated using scaffolds [Kaigler et al., 2006a; Yu et al., 2008]. The microspheres were implanted in a 0.9 mm diameter sized bone defect in the femur of mice. When implanted in the bone defect, alginate microspheres containing immobilized cells (HOPs or HOPs/HUVECs) had a positive effect on mineralization and bone regeneration compared to microspheres alone. Moreover, when osteoprogenitors were co-immobilized with endothelial cells, mineralization of the microspheres significantly increased. These results further demonstrated that endothelial cells have a synergistic effect on bone regeneration stimulated by osteoprogenitors in this environment.

VEGF secretion was detected in the culture medium surrounding microspheres containing cells. Hence, it may be concluded that VEGF was also released out from the microspheres after implantation.

5. Conclusions

In this study it was hypothesized that endothelial cells could regulate osteogenic potential of osteoprogenitor cells *in vitro* and *in vivo* when co-immobilized within alginate microspheres modified with the RGD peptidic sequence.

In vitro studies, in dynamic conditions, showed increased cell metabolic activity and upregulation of gene expression of alkaline phosphatase and osteocalcin, as well mineralization when osteoprogenitor cells were co-immobilized with endothelial cells. Furthermore, *in vivo* studies after implantation in a long bone defect showed that immobilized cells enhanced mineralization inside and around the implanted microspheres and when osteoprogenitor were co-immobilized with endothelial cells, mineralization was significantly increased.

The present findings clearly show that co-immobilization of osteogenic and endothelial cells within RGD-alginate microspheres is a promising strategy for bone tissue engineering. This system constitutes a new strategy of injectable device for cell therapy to enhance bone healing.

Acknowledgments

This work was supported by grants from INSERM ANR PNano, “Agence de Biomédecine”, the French Ministry “de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” and from the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT; POCI/SAU-BMA/55556/2004).

References

- [1] Oreffo RO, Triffitt JT. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. *Bone* 1999; 25: 5S-9S.
- [2] Lubiatowski P, Kruczynski J, Gradys A, Trzeciak T, Jaroszewski J. Articular cartilage repair by means of biodegradable scaffolds. *Transplant Proc* 2006; 38: 320-2.

- [3] Evangelista MB, Hsiong SX, Fernandes R, Sampaio P, Kong HJ, Barrias CC, *et al.* Upregulation of bone cell differentiation through immobilization within a synthetic extracellular matrix. *Biomaterials* 2007; 28: 3644-55.
- [4] Gerber HP, Ferrara N. Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10: 223-8.
- [5] Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 2003; 8: 980-9.
- [6] Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Lowik CW. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* 2000; 141: 1667-74.
- [7] Guillotin B, Bourget C, Remy-Zolgadri M, Bareille R, Fernandez P, Conrad V, *et al.* Human primary endothelial cells stimulate human osteoprogenitor cell differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2004; 14: 325-32.
- [8] Villars F, Bordenave L, Bareille R, Amedee J. Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF? *J Cell Biochem* 2000; 79: 672-85.
- [9] Kaigler D, Krebsbach PH, Wang Z, West ER, Horger K, Mooney DJ. Transplanted endothelial cells enhance orthotopic bone regeneration. *J Dent Res* 2006; 85: 633-7.
- [10] Sun H, Qu Z, Guo Y, Zang G, Yang B. In vitro and in vivo effects of rat kidney vascular endothelial cells on osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells growing on polylactide-glycolic acid (PLGA) scaffolds. *Biomed Eng Online* 2007; 6: 41.
- [11] Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci* 2006; 6: 623-33.
- [12] Leal D, Matsushiro B, Rossi M, Caruso F. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydrate research* 2008; 343: 308-16.
- [13] Keshaw H, Forbes A, Day RM. Release of angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass. *Biomaterials* 2005; 26: 4171-9.
- [14] Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Franceschi RT, Mooney DJ. Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering. *J Dent Res* 2001; 80: 2025-9.
- [15] Abbah SA, Lu WW, Chan D, Cheung KM, Liu WG, Zhao F, *et al.* In vitro evaluation of alginate encapsulated adipose-tissue stromal cells for use as injectable bone graft substitute. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 347: 185-91.
- [16] Barrias CC, Lamghari M, Granja PL, Sa Miranda MC, Barbosa MA. Biological evaluation of calcium alginate microspheres as a vehicle for the localized delivery of a therapeutic enzyme. *J Biomed Mater Res A* 2005; 74: 545-52.
- [17] Durrieu MC, Pallu S, Guillemot F, Bareille R, Amedee J, Baquey CH, *et al.* Grafting RGD containing peptides onto hydroxyapatite to promote osteoblastic cells adhesion. *J Mater Sci Mater Med* 2004; 15: 779-86.
- [18] Kong HJ, Smith MK, Mooney DJ. Designing alginate hydrogels to maintain viability of immobilized cells. *Biomaterials* 2003; 24: 4023-9.
- [19] Bordenave L, Baquey C, Bareille R, Lefebvre F, Lauroua C, Guerin V, *et al.* Endothelial cell compatibility testing of three different Pellethanes. *J Biomed Mater Res* 1993; 27: 1367-81.
- [20] Jaffe EA. Culture of human endothelial cells. *Transplant Proc* 1980; 12: 49-53.
- [21] Rowley JA, Mooney DJ. Alginate type and RGD density control myoblast phenotype. *J Biomed Mater Res* 2002; 60: 217-23.
- [22] Villars F, Guillotin B, Amedee T, Dutoya S, Bordenave L, Bareille R, *et al.* Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C775-85.

- [23] Clarkin CE, Emery RJ, Pitsillides AA, Wheeler-Jones CP. Evaluation of VEGF-mediated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells. *J Cell Physiol* 2007.
- [24] Cheng C, Liu H, Ge H, Qian J, Qin J, Sun L, *et al.* Essential role of Src suppressed C kinase substrates in endothelial cell adhesion and spreading. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 342-8.
- [25] Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, *et al.* Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998; 273: 30336-43.
- [26] Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 201-7.
- [27] Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA, *et al.* Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg* 2002; 109: 2384-97.
- [28] Simmons CA, Alsberg E, Hsiong S, Kim WJ, Mooney DJ. Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone* 2004; 35: 562-9.
- [29] Lu HH, Vo JM, Chin HS, Lin J, Cozin M, Tsay R, *et al.* Controlled delivery of platelet-rich plasma-derived growth factors for bone formation. *J Biomed Mater Res A* 2008.
- [30] Yu H, Vandevord PJ, Gong W, Wu B, Song Z, Matthew HW, *et al.* Promotion of osteogenesis in tissue-engineered bone by pre-seeding endothelial progenitor cells-derived endothelial cells. *J Orthop Res* 2008; 26: 1147-52.

Figure Legends

Figure 1

Cell immobilization within modified alginate microspheres. Human osteoprogenitor cells (HOPs) alone or co-cultures of HOPs with Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) immobilized within alginate previously irradiated, oxidized and covalently coupled with a peptidic containing the RGD sequence. The diameter of the generated microspheres was between 200 µm and 500 µm. Cell repartition was homogeneous. Scale bar: 100 µm.

Figure 2

Metabolic activity of immobilized cells. MTS test was performed to determine metabolic activity of immobilized Human osteoprogenitors (HOPs) and Human umbilical vein

endothelial cells (HUVECs), as well as co-immobilized HOPs/HUVECs within RGD-alginate microspheres after 1, 8, 15 and 22 days of dynamic *in vitro* culture. Immobilized HUVECs exhibited little or no metabolic activity after 8 days of culture. Immobilized HOPs and co-immobilized HOPs/HUVECs revealed an increasing activity during the study period.

Figure 3

Phenotype of immobilized cells. Q-PCR was carried out to follow specific gene expression of endothelial and osteoblastic phenotypes of immobilized cells after 1, 8, 15 and 22 days of *in vitro* culture. (A): Co-immobilized HUVECs with HOPs expressed vWF mRNA for 3 weeks, with a decrease after 15 days; (B): ALP and OC specific gene expression of osteoblastic phenotype were expressed by immobilized HOPs and co-immobilized HOPs. When HOPs were co-immobilized with HUVECs, gene expressions of ALP and OC increased significantly, compared to HOPs alone.

Figure 4

Mineralization of immobilized cells after *in vitro* culture. Human osteoprogenitors (HOPs) or HOPs with Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were immobilized within alginate microspheres, embedded in paraffin and were stained with Von Kossa after 1 and 22 days of *in vitro* dynamic culture conditions. Mineralization of HOPs seemed to slightly decrease after 22 days of culture. However, the co-immobilization of HOPs with HUVECs promoted increased mineralization after 22 days of culture.

Figure 5

VEGF expression in immobilized cells. (A): Gene expression of VEGF₁₆₅ was analysed by Q-PCR in immobilized Human osteoprogenitors (HOPs) and co-culture of HOPs with Human

umbilical vein endothelial cells (HUVECs). A difference between HOP and co-culture gene expression was noticed at days 15 and 22 post-immobilization. (B): The protein amount was measured by ELISA test in the supernates of both cultures. At each time points, a higher amount of VEGF was secreted by the HOPs in co-culture compared to HOPs immobilized alone.

Figure 6

X-rays micro computer tomography images of bone regeneration. Bone defects (0.9mm of diameter) were performed in the femoral metaphysis of *nude* mice. RGD-alginate microspheres containing no cells, only Human osteoprogenitors (HOPs) or HOPs co-immobilized with Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were implanted and bone regeneration was followed by μ CT after 3 and 6 weeks. Little or no mineralization was observed when alginate alone was implanted in the bone defect. When only HOPs were implanted, modest mineralization around and inside the microspheres was generated 3 and 6 weeks post-implantation, respectively. However, co-immobilization of HOPs and HUVECs led to a strong mineralization inside the microspheres already after 3 weeks after implantation. Higher magnifications of the white squares are showed below (x2).

Figure 7

Von Kossa staining of regenerated bone defects and mineralization quantification. Bone defects were performed in the femoral metaphysis of *nude* mice and RGD-alginate microspheres containing no cells, only Human osteoprogenitors (HOPs) or HOPs co-immobilized with Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were implanted. Mineralization was followed by von Kossa staining after 3 and 6 weeks. (A): Arrows show alginate beads. No mineralization was observed when alginate microspheres containing no

cells were implanted in the bone defects. When only immobilized HOPs were implanted, some mineralization nodules were generated 3 and 6 weeks post-implantation. However, co-immobilization of HOPs and HUVECs led to mineralization inside the microspheres at 3 weeks post-implantation and mineralization deposition was clearly observed at 6 weeks post-implantation. Original magnification: x4. (B): Quantification of mineralization revealed by von Kossa staining. The presence of cells significantly increased mineralization of bone defects after 3 and 6 weeks, compared to alginate microspheres implanted with no cells. After 6 weeks implantation of co-immobilized HOPs/HUVECs, mineralization was significantly higher than with HOPs immobilized alone. Significance was calculated by Mann-Whitney's U test (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

Figures

Figure 1

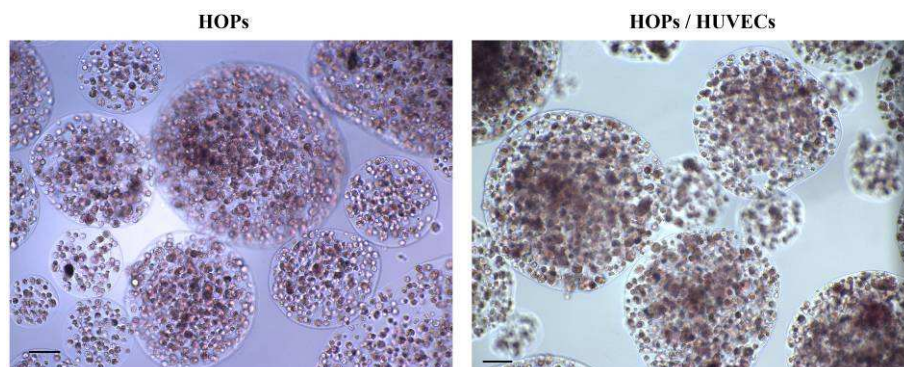


Figure 2

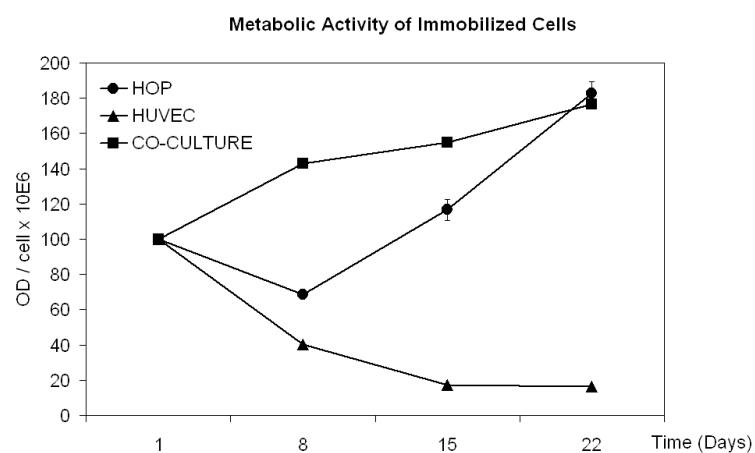


Figure 3

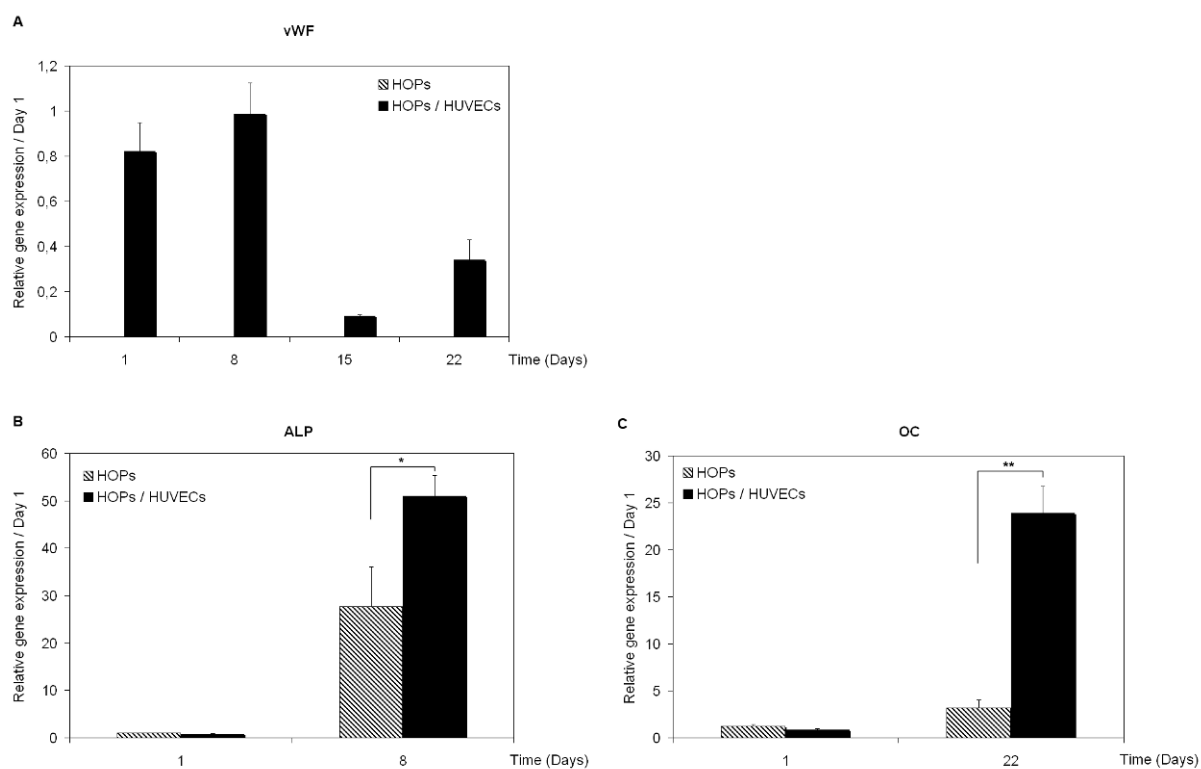


Figure 4

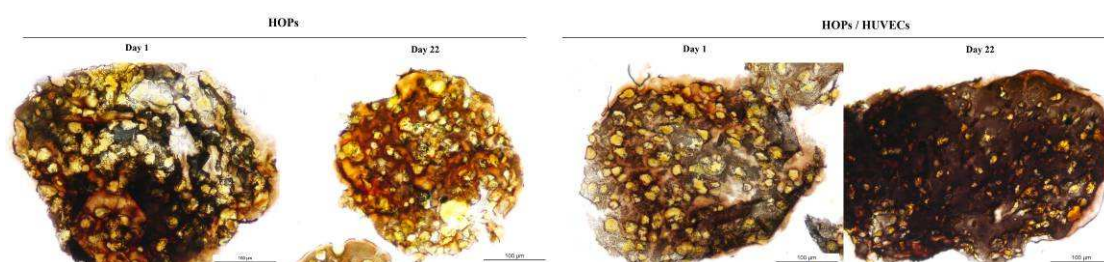


Figure 5

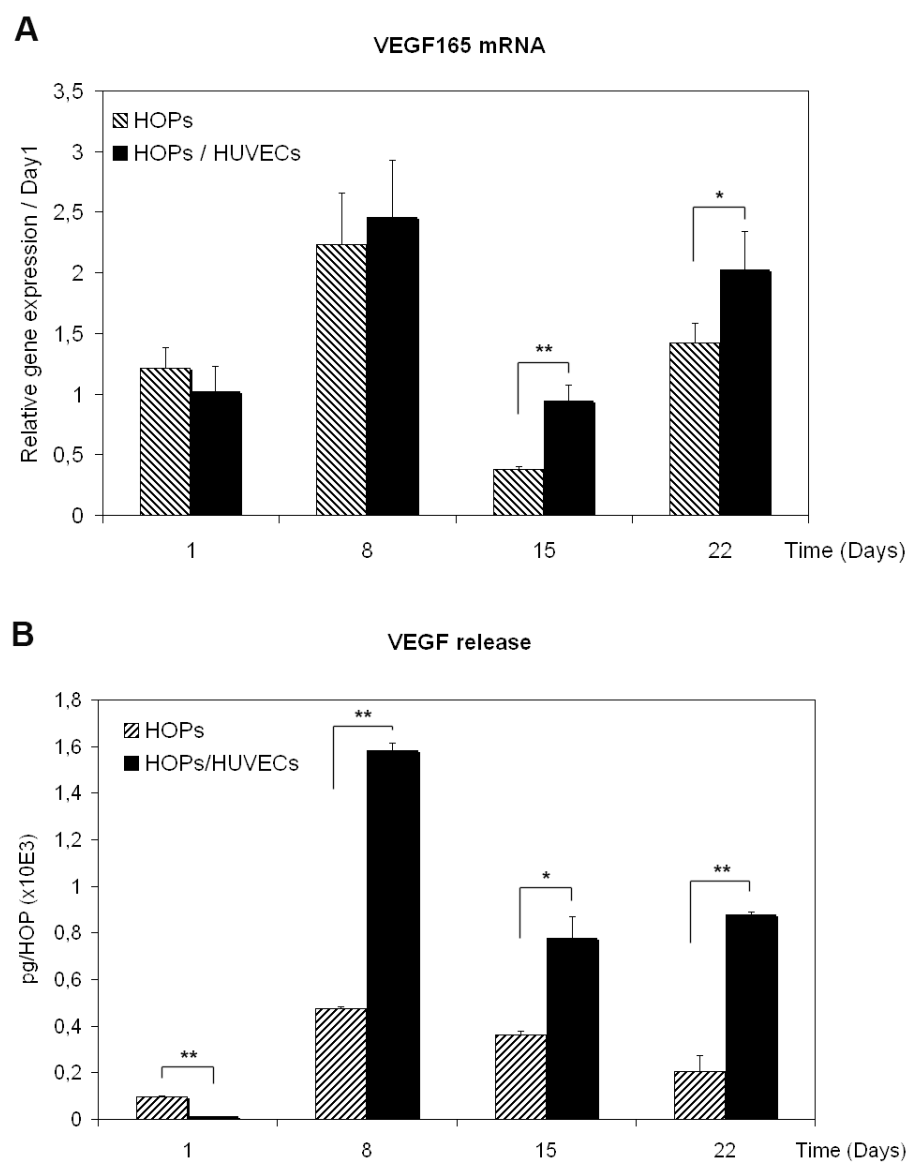


Figure 6

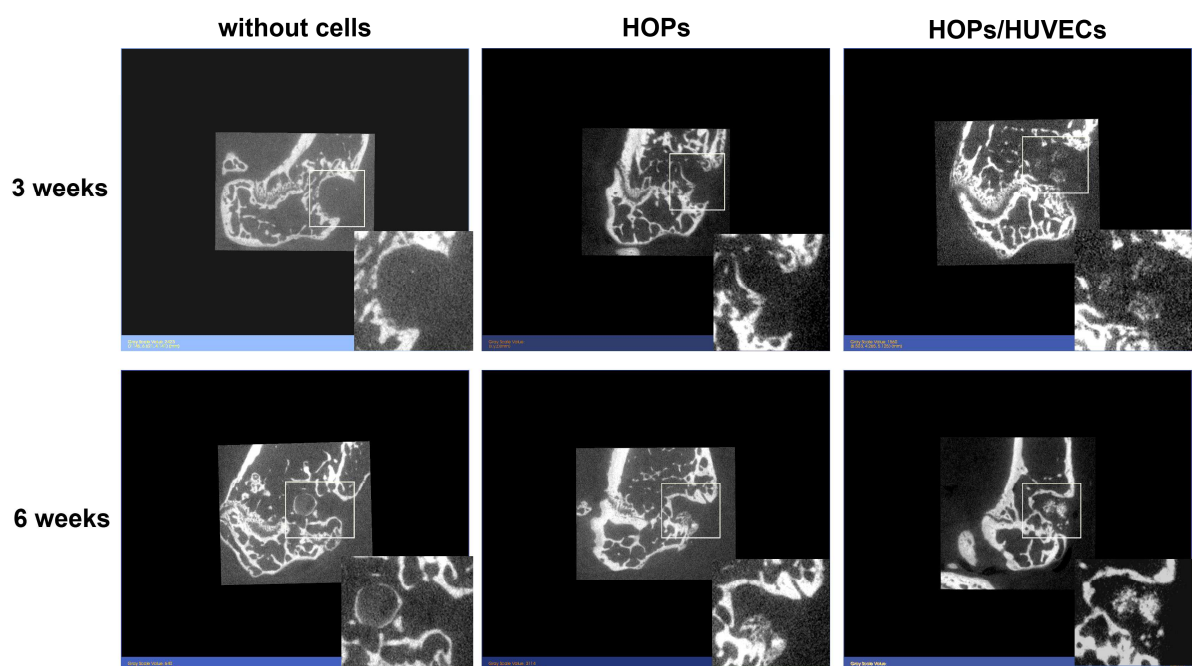
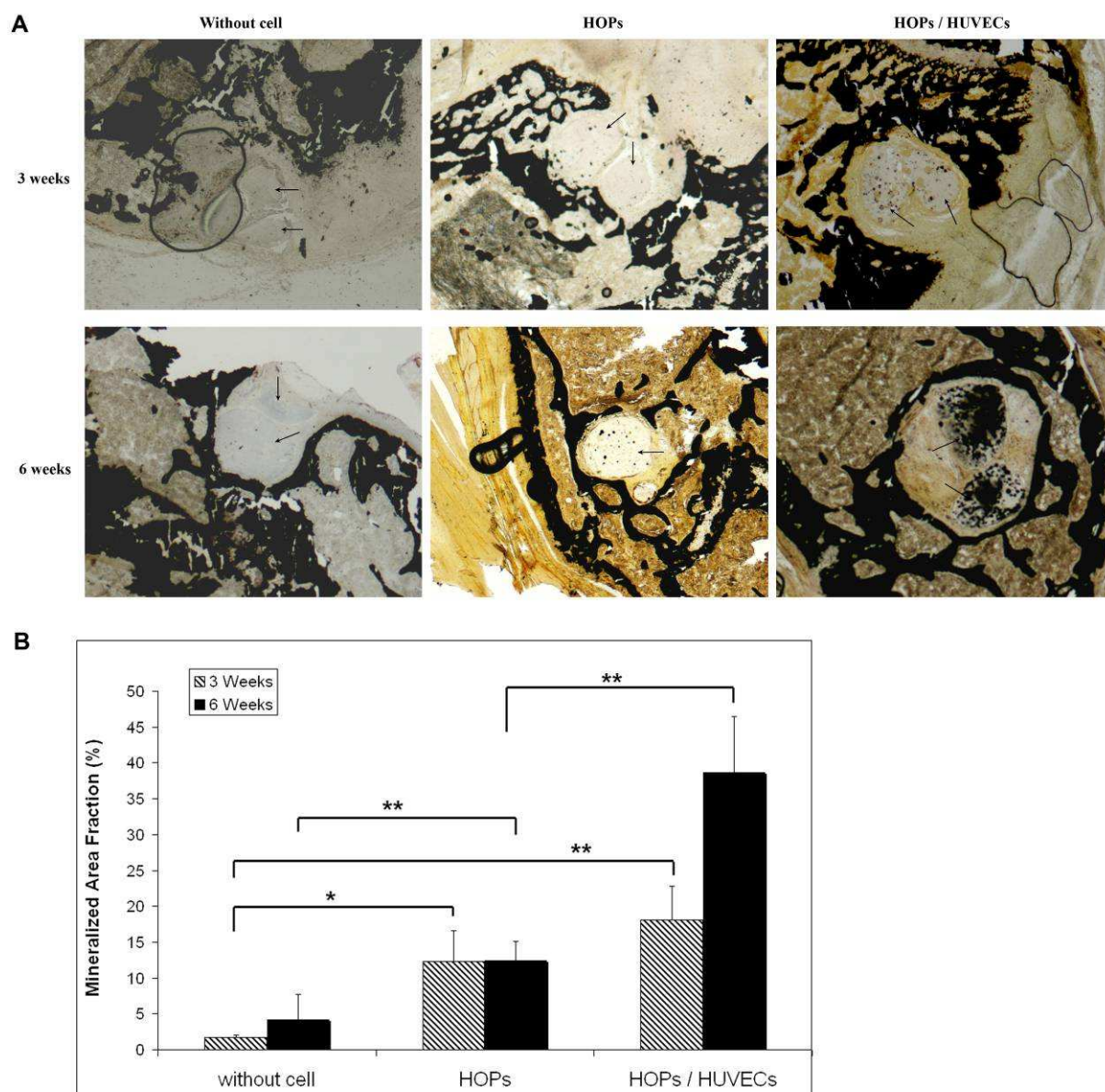


Figure 7



C. Conclusions

Dans cette étude, les cellules HOPs ou les deux types cellulaires HOPs et HUVECs en co-culture ont été immobilisés dans des microsphères d'alginate fonctionnalisées par des peptides d'adhésion et cultivées dans un bioréacteur pendant un maximum de 3 semaines. La répartition des cellules à l'intérieur des microsphères apparaît homogène, mais les cellules ne semblent pas étalées dans les microsphères malgré la présence des séquences RGD greffées à l'alginate. Cependant, Evangelista et al. ont montré une meilleure organisation du cytosquelette d'actine des cellules immobilisées dans l'alginate modifiées par la séquence contenant le motif RGD [Evangelista et al., 2007]. L'analyse par MTS montre que l'activité métabolique des cellules augmente au cours du temps, notamment lorsque les cellules sont en co-culture. Cependant, ce système 3D ne semble pas permettre une prolifération rapide des cellules ce qui laisse supposer que ces dernières ont plutôt tendance à synthétiser une matrice extracellulaire.

En ce qui concerne le phénotype cellulaire, l'analyse du vWF indique que le phénotype des cellules endothéliales semble être stable. De la même manière que dans le système en 2D, la co-culture HOPs / HUVECs stimule la différenciation des ostéoprogéniteurs. L'expression génique de la PAL et de l'OC seraient augmentés lorsque la co-culture est encapsulée dans l'alginate. Cependant, l'augmentation de l'activité de la PAL induite par la co-culture en 2D a été observée dès 3 jours de culture contre 8 jours de culture dans une matrice tridimensionnelle. Une étude plus avancée de l'expression de ce marqueur précoce aurait été nécessaire. D'autre part, l'expression de l'ostéocalcine diminue après 3 jours de co-culture en 2D alors qu'elle augmente lorsque les cellules sont en co-culture dans une matrice tridimensionnelle pendant 3 semaines. Enfin, la coloration au Von Kossa des microsphères montre que la co-culture en 3D stimule la minéralisation de la matrice extracellulaire, par rapport à la culture des HOPs cultivées seules dans ces matrices d'alginate.

D'autre part, une sécrétion de VEGF₁₆₅ a été observée dans le surnageant des microsphères contenant les HOPs et cette sécrétion est significativement supérieure lorsque les microsphères contiennent la co-culture HOPs / HUVECs. Ceci indique que les cellules sont capables de sécréter des facteurs solubles à l'extérieur des microsphères et qu'elles seraient donc capables de communiquer avec l'environnement extérieur dans le cas d'une implantation *in vivo*. En outre, le VEGF₁₆₅ pourrait jouer un rôle dans la stimulation de l'activité endothéliale qui agirait en retour sur la différenciation des ostéoprogéniteurs en sécrétant des facteurs ostéogéniques, comme cela a été suggéré dans l'étude des co-cultures HOPs / HUVECs en 2D.

Dans un deuxième temps, ces microsphères fonctionnalisées et cellularisées ont été implantées dans un défaut osseux fémoral chez la Souris *nude*. Après 3 semaines d'implantation, nous avons observé une faible minéralisation autour des microsphères implantées lorsque celles-ci ne contiennent aucune cellule, ou seulement des HOPs. Dans ce même groupe de microsphères (HOPs), la minéralisation s'accroît à l'intérieur des microsphères après 6 semaines d'implantation. Par contre, dès lors que les microsphères contiennent la co-culture HOPs / HUVECs, la minéralisation apparaît à l'intérieur des billes dès 3 semaines d'implantation. Ceci a été vérifié par une technique de micro-tomographie à rayons X assistée par ordinateur (μ CT) et par histologie. Ces résultats semblent démontrer que la présence des HUVECs stimule le potentiel de minéralisation des HOPs aussi bien *in*

vitro en culture en bioréacteur, et *in vivo*, lorsque ces microsphères sont implantées au sein d'un défaut osseux réalisé chez la Souris *nude*.

Cependant, si l'alginate permet aux cellules ostéoblastiques et endothéliales de communiquer et de produire des facteurs angiogènes, ce système ne permet pas de régénérer un tissu osseux autour de ces microsphères et de combler la lésion osseuse. Un système plus « ouvert » doit être proposé pour favoriser une néoformation osseuse et une néo-vascularisation du tissu néoformé.

Dans cette étude, nous n'avons pas pu quantifier la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans les microsphères après implantation *in vivo*. Néanmoins, Kaigler et al. ont démontré que même si une source de cellules endothéliales est apportée au site d'implantation, le nombre de néo-vaisseaux formés ne varie pas, seule leur origine varie [Kaigler et al., 2006a]. En effet, lors d'une lésion osseuse chez le Rat, les cellules endothéliales exogènes apportées au site de fracture participent à la néo-vascularisation de la réparation osseuse mais le nombre de vaisseaux formés ne varie pas. Un marquage immuno-cytochimique dirigé contre le CD31 ou encore l'utilisation d'agents de contraste tels que le sulfate de baryum suivie d'une analyse par micro-tomographie à rayons X pourrait permettre de visualiser et de quantifier la néo-vascularisation. La résolution des images restera éventuellement la limite de cette technique d'imagerie.

En conclusion, ce système 3D peut évoluer vers d'autres types de polymères, associés ou non avec du phosphate de calcium, des facteurs de croissance ou encore un mélange de peptides contenant des séquences d'adhésion telles que le motif RGD, REDV ou YIGRS susceptibles d'améliorer l'adhésion et le recrutement des deux types cellulaires dans le polymère.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Dans ce travail, la communication existant entre des cellules de type ostéoblastique et endothélial a été étudiée dans un premier temps, à l'aide d'un système de co-culture *in vitro* en double dimension et dans un second temps, au sein d'une matrice en trois dimensions. Puis, cette coopération cellulaire a été utilisée afin d'analyser sa capacité à induire une minéralisation osseuse *in vivo* à l'aide d'un modèle expérimental chez la souris *nude*.

Dans une première partie, les modèles cellulaires utilisés pour ce travail ont été caractérisés. Les cellules ostéoprogénitrices humaines sont issues de l'induction des cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse vers le lignage ostéoblastique et présentent toutes les caractéristiques phénotypiques des précurseurs ostéoblastiques. Le premier travail de cette thèse a montré que ces cellules sont également capables de répondre à une stimulation par des contraintes de cisaillement dans un système en 2D. Ces cellules seraient donc potentiellement capables de répondre aux contraintes mécaniques qu'elles pourraient subir dans un contexte *in vivo*, dans un environnement osseux.

Les cellules endothéliales utilisées dans ce travail sont des cellules déjà matures, issues de la veine du cordon ombilicale et exprimant les marqueurs spécifiques du phénotype endothélial. Ces cellules constituent un bon modèle de cellules endothéliales mais ne peuvent pas être utilisées en clinique. Compte tenu que les cellules mésenchymateuses issues de la moelle osseuse est la source privilégiée des ostéoprogéniteurs, l'isolement de progéniteurs endothéliaux à partir de cette source à été envisagée. Néanmoins, la différenciation des cellules souches issues de la moelle osseuse vers un lignage de type endothélial reste difficile même si quelques succès ont été obtenus [Jiang et al., 2002; Thebaud et al., 2007]. L'isolement de ces progéniteurs issus du sang périphérique fait maintenant l'objet d'un sujet de thèse au sein de notre laboratoire et les premiers résultats obtenus sont prometteurs.

De plus, dans un contexte d'ingénierie tissulaire et de thérapie cellulaire, l'idéal serait de disposer de la même source biologique pour les deux types cellulaires implantés. Plusieurs études montrent que le tissu adipeux contient des cellules souches adultes capables de se différencier en un grand nombre de types cellulaires dont les cellules ostéoblastiques et endothéliales. Le tissu adipeux semble donc prometteur et il pourrait fournir une quantité suffisante de cellules progénitrices, avec une technique de prélèvement moins invasive pour le patient.

Dans ce travail, les cellules ostéoprogénitrices issues de la moelle osseuse humaine et les cellules endothéliales issues de la veine du cordon ombilical sont capables de communiquer entre elles et chacun des types cellulaires peut avoir une influence sur le phénotype de l'autre. Dans un système *in vitro* en double dimension, le phénotype ostéoblastique des ostéoprogéniteurs humains est stimulé par la présence des cellules endothéliales. De même, le phénotype endothélial et notamment la capacité des HUVECs à former une structure cellulaire proche de capillaires est stimulée lorsque les HUVECs sont en co-culture avec les HOPs.

Différents modes de communication peuvent exister et nous nous sommes intéressés principalement à la production de facteurs solubles pouvant agir de manière autocrine et/ou paracrine sur les deux types cellulaires. Les ostéoprogéniteurs humains expriment le VEGF₁₆₅ qui semble être utilisé par les cellules endothéliales en co-culture. Cependant, les résultats montrent que le VEGF₁₆₅ à lui seul ne suffit pas à induire le réarrangement cellulaire

observé en co-culture. Il reste donc à identifier les facteurs solubles responsables de cette migration cellulaire. Notre recherche se dirigera vers des facteurs à fort pouvoir chimioattractant tels que le SDF-1.

Cependant, le VEGF₁₆₅ et l'activité de ses récepteurs Flt-1 et KDR sont nécessaires à la stimulation du phénotype ostéoblastique des HOPs co-cultivées avec les HUVECs. Une des perspectives majeures de ce travail est d'identifier les voies de signalisation exactes activées par le VEGF₁₆₅ responsables de la régulation du phénotype ostéoblastique. L'analyse d'autres modes de communication a été également envisagée et les résultats préliminaires concernant l'analyse des jonctions adhérentes et des interactions avec la matrice extracellulaire démontrent que ces voies de communication entrent probablement en jeu. Leurs mécanismes précis restent donc à élucider.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la capacité de ces co-cultures à communiquer au sein d'une matrice tridimensionnelle. Les HOPs et HUVECs ont été encapsulés dans des microsphères d'alginate et gardés en culture sous contraintes dynamiques en bioréacteur. L'alginate ne favorise pas l'adhésion des cellules et l'utilisation d'autres polymères ou du même polymère mais présentant des meilleures propriétés adhésives est envisagée. De plus, l'activité métabolique des cellules immobilisées dans les microsphères est inhibée lorsqu'il s'agit des HUVECs immobilisées seules. Une meilleure perfusion du matériau pourrait permettre un apport en oxygène et nutriments plus efficace et favoriser la prolifération des cellules. Un matériau composite mêlant l'alginate à une céramique telle que l'hydroxyapatite pourrait favoriser la porosité du matériau et inciter ainsi la prolifération et l'activité des cellules puis l'invasion du matériau par les cellules hôtes.

De la même manière que dans le système 2D, les ostéoprogéniteurs et les cellules endothéliales co-immobilisés dans les microsphères d'alginate sont capables de communiquer et d'agir sur leurs phénotypes respectifs. Ainsi, l'activité de la PAL et la minéralisation de la matrice induite par les HOPs sont stimulées lorsque ces cellules sont co-immobilisées dans l'alginate avec les HUVECs. La sécrétion de VEGF₁₆₅ par les cellules immobilisées dans l'alginate a été détectée et est stimulée lorsque les deux types cellulaires sont co-immobilisés. L'analyse de la sécrétion d'autres facteurs solubles, à pouvoir angiogène et/ou ostéogénique, est également envisagée.

Enfin, les microsphères ont été implantées dans une lésion osseuse de 0,9 mm de diamètre au niveau de la plaque de croissance du fémur chez le petit animal. Le modèle de Souris *nude* a été choisi afin de pouvoir implanter des cellules humaines. Cependant, l'utilisation du Rat athymique pourrait être intéressante et prometteuse car ce modèle pourrait permettre de disposer d'une lésion osseuse de taille plus importante, plus facile à manipuler et les techniques d'imagerie pourraient offrir une meilleure résolution. D'autres techniques d'analyse sont envisageables telles que le SPECT (Single photon emission computed tomography ou TEM : tomographie d'émission monophotonique) qui permettrait de mieux visualiser les vaisseaux sanguins.

Enfin, si la co-culture HOPs / HUVECs véhiculée par l'alginate au sein d'un environnement osseux stimule le potentiel ostéogénique des ostéoprogéniteurs et induit une forte minéralisation à l'intérieur des microsphères, ce système ne permet pas la réparation complète de la lésion et la formation d'un néo-tissu. Une des solutions envisagées afin de favoriser la régénération osseuse est de cultiver les microsphères d'alginate pendant une

plus longue période *in vitro* sous contraintes dynamiques. Ainsi, sous la stimulation des facteurs biochimiques et mécaniques, une pré-vascularisation du matériau hybride pourrait apparaître.

Dans tous les cas, l'association de ces deux lignages cellulaires au sein d'une matrice pertinente pourrait ouvrir d'importantes perspectives dans les techniques d'ingénierie du tissu osseux, principalement pour les pertes massives d'os où la vascularisation du tissu néo-formé reste à ce jour la principale limite des techniques existantes.

ANNEXES

Annexe 1. Compléments de matériels et méthodes

Culture Cellulaire

- Culture des HUVECs

La procédure de préparation des cellules endothéliales humaines issues de veines ombilicales correspond à celle précédemment décrite par Bordenave et al. [Bordenave et al., 1993] selon la méthode originale de Jaffe et al. [Jaffe, 1980].

Les cordons ombilicaux clampés, immédiatement prélevés après la délivrance sont immergés dans un tampon phosphate PBS 0,1 M pH 7,4 contenant du glucose à 0,2 % (p/v) (PBS/glucosé) et sont conservés à 4°C. Les cordons sont ensuite traités dans les 24 heures qui suivent le prélèvement.

Le principe du recueil des cellules endothéliales humaines issues de veine ombilicale (HUVECs) consiste à perfuser la veine avec une solution enzymatique de collagénase (Boehringer, Mannheim) à 0,2 % (p/v) dans du tampon PBS 0,1 M pH 7,4 afin de détacher les cellules de leur membrane basale. Cette perfusion est réalisée par canulation de chaque extrémité de la veine ombilicale. Après rinçage de la veine ombilicale avec du tampon PBS/glucosé, stérilisé par filtration sur un filtre de 0,22 µm (Millipore™) et chauffé à 37°C, 4 mL d'une solution de collagénase à 0,2 % (p/v) à 37°C sont injectés dans la veine, et le système entier est lui-même incubé 5-7 min à 37°C dans le tampon PBS 0,1 M pH 7,4. La suspension de cellules endothéliales est ensuite recueillie en perfusant 50 mL de tampon PBS/glucosé. La suspension cellulaire est alors centrifugée 10 min à 300g. Le culot cellulaire est remis en suspension dans 5 mL de milieu de culture IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium), supplémenté par 20 % (v/v) de SVF (Sérum de Veau Fœtal), auquel sont rajoutées les solutions antibiotiques (pénicilline 100 UI/mL et streptomycine 10 µg/mL ; Sigma, Saint Louis). La suspension cellulaire estensemencée directement dans une boîte de 25 cm². Les cellules sont placées dans un incubateur thermostaté à 37°C avec une atmosphère enrichie de 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité.

Le renouvellement du milieu se fait toutes les 48 ou 72 heures. Le milieu utilisé est similaire à celui employé pour l'ensemencement mais additionné du facteur de croissance (Endothelial Cell Growth Supplement : ECGS 20 µg/mL, Sigma) et d'héparine porcine 90 µg/mL (Sigma). Suivant la densité cellulaire de départ, la confluence est atteinte vers le 4-7^{ème} jour et les passages sont réalisés par méthode enzymatique à l'aide d'une solution de trypsine 0,2 % (p/v), 5 mM EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) dans du PBS 0,1 M sans calcium ni magnésium à pH 7,4. Au cours de nos études, le nombre de passages n'excédera pas deux.

- Culture des HOPs

Les prélèvements de moelle osseuse sont effectués à partir de la diaphyse fémorale par le service du Professeur Durandeau (CHR Pellegrin - Bordeaux) sur des patients âgés de 20 à 70 ans bénéficiant d'une intervention chirurgicale pratiquée à la suite d'un traumatisme osseux et ayant donné leur consentement. La suspension obtenue est placée dans un flacon stérile contenant du milieu de culture IMDM et conservé à 4°C jusqu'à l'utilisation.

La suspension de moelle osseuse est passée successivement à travers des aiguilles de calibre interne décroissant (16-, 18-, et 21-gauge). Cette suspension est ensuite centrifugée pendant 10 min à 300g et le culot, après élimination du surnageant, est resuspendu dans du milieu IMDM. La suspension est alors diluée afin de répartir 3×10^7 cellules nucléées par boîte de 75 cm² dans 10 mL de milieu IMDM supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (Gibco) additionné de dexaméthasone à 10^{-8} M. L'emploi de dexaméthasone au début de la culture cellulaire permet de stimuler la différenciation des cellules stromales vers un phénotype ostéoblastique. Les cellules sont alors incubées dans une étuve à 37°C en présence d'une atmosphère enrichie de 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité [Vilamitjana-Amedee et al., 1993; Villars et al., 2000].

Après 5 jours de culture, le surnageant est éliminé et remplacé par du milieu de culture complet supplémenté en dexaméthasone. Le rythme de renouvellement du milieu de culture est de 3-5 jours et après 2 semaines de culture, la dexaméthasone n'est plus rajoutée dans le milieu de culture. Dès que la confluence cellulaire est atteinte, une nouvelle génération cellulaire est obtenue en détachant les cellules de la culture primaire à l'aide d'une solution de trypsine 0,2 % (p/v), 5 mM EDTA dans le tampon PBS 0,1 M sans calcium ni magnésium à pH 7,4. Au cours de nos études, le nombre de passages n'excèdera pas 3.

La recherche de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL) intracellulaire, premier marqueur de différenciation de type ostéoblastique, est alors mesurée de façon systématique lors de chaque passage par une méthode de coloration cytochimique semi-quantitative.

Les co-cultures en contact direct sont réalisées en ensemençant les deux types cellulaires en même temps, avec une densité de HOPs de 15 000 cellules / cm² et de HUVECs de 30 000 cellules / cm². Le milieu de culture utilisé en co-culture directe est le même que celui utilisé pour les cellules osseuses cultivées seules (IMDM complémenté avec 10 % (v/v) de SVF).

- Culture des HUVECs sur Matrigel

Trois cents microlitres d'une solution de Matrigel sont déposés dans un puits de culture de 2cm² et incubés à 37°C pendant 30 minutes en conditions stériles afin que la solution forme un gel. Puis, les HUVECs sont ensemençées sur ce gel de Matrigel à la densité de 100 000 cellules / cm² dans le même milieu de culture que celui utilisé pour la culture classique des HUVECs. La formation des réseaux a été observée après 48h de culture à 37°C.

Caractérisation cellulaire par immunofluorescence et cytochimie

Afin de caractériser les HUVECs, la monocouche cellulaire a été lavée avec du HBSS (Hank's Buffer Salt Solution) puis fixée à l'aide de paraformaldéhyde (PFA) 4% (v/v). Les cellules sont alors incubées 1 heure à 37°C dans une solution de HBSS-1% de Sérum Albumine Bovine afin de saturer les sites non spécifiques. La couche cellulaire est ensuite incubée pendant 1 heure à 37°C avec un anticorps primaire dirigé contre le vWF (lapin, 1/500^{ème}, DAKO), le CD31 (souris, 1/500^{ème}, DAKO) ou la VE-Cadhérine (lapin, 1/400^{ème}, CST) dans du HBSS-0,5% SAB. Puis, les cellules sont lavées dans du HBSS puis incubées

pendant 1 heure à 37°C en présence de l'anticorps secondaire anti-IgG de souris ou de lapin conjugué à l'Alexa 488 dilué au 1/400^{ème} dans du PBS-1% SAB.

Les co-cultures HOPs/HUVECs et cultures isolées de HOPs et de HUVECs sont ensemencées dans des puits de plaques 24 puits et cultivées selon la méthode décrite précédemment. Au temps expérimentaux voulus, la couche cellulaire est lavée avec du tampon PBS 0,1 M pH 7,4 et fixée par du PFA 4 % dans du PBS 0,1 M pH 7,4 pendant 20 min à 4°C. Les cellules sont alors rincées 3 fois avec du PBS 0,1 M pH 7,4 et incubées 1 heure à 37°C dans une solution de PBS-1% SAB afin de saturer les sites non spécifiques. La couche cellulaire est ensuite incubée pendant 1 heures à 37°C avec un anticorps primaire dirigé contre la β -caténine (CST) dilué au 1/300^{ème} dans du PBS 0,1 M pH 7,4 ; SAB 0,5 % (v/v) (PBS-SAB). De la même manière, les cellules sont lavées dans du PBS puis incubées pendant 1 heure à 37°C en présence de l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin conjugué à l'Alexa 488 dilué au 1/400^{ème} dans du PBS-SAB. Comme précédemment les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS. Les noyaux cellulaires sont révélés par l'incubation des cellules avec du DAPI pendant 10 minutes à 1 μ g/mL dilué dans l'eau qui se fixe à l'ADN. Les cellules sont alors observées avec un microscope droit à fluorescence Nikon équipé des filtres appropriés. Des contrôles négatifs ont été réalisés en incubant les cellules avec l'anticorps secondaire uniquement.

Séparation des cellules après la co-culture à l'aide de billes immuno-magnétiques

Après la co-culture, les cellules sont récupérées par traitement à la trypsine 0,2 % (p/v), 5 mM EDTA et lavées par du PBS par centrifugation. Les deux types cellulaires sont incubés pendant 30 minutes à 4°C en présence de billes magnétiques couplées à un anticorps reconnaissant spécifiquement le CD31, protéine membranaire spécifique des cellules endothéliales (10 billes par cellule endothéliale). La suspension cellulaire est alors placée dans un système aimanté permettant de retenir les cellules endothéliales fixées aux billes magnétiques et lavée par une solution de PBS-1% SAB. Le surnageant non retenu par l'aimant contient essentiellement les cellules ostéoprogénitrices. La pureté des préparations cellulaires ainsi séparées a été analysée par des techniques de PCR et d'immunomarquage [Guillotin et al., 2008].

PCR quantitative en temps réel (Q-PCR)

L'ARN total des cellules est extrait en utilisant le kit « RNeasy™ Total RNA kit » (QIAGEN) et l'ADN complémentaire a été synthétisé à partir d'1 μ g d'ARN grâce au système d'amplification « Superscript preamplification system » (Gibco) dans un volume final de 20 μ l contenant 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml SAB, 10 mM DTT, 0.5 mM of each dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.5 μ g oligo(dT)₁₂₋₁₈, et 200 U d'enzyme transcriptase inverse. Après l'incubation à 42°C pendant 50 min, la réaction est stoppée à 70°C pendant 15 minutes.

Cinq microlitres d'ADN dilué au 1/80^{ème} sont chargés dans les puits d'une plaque 96 puits. Une solution de SYBR-Green Supermix® (2X iQ™, BioRad) est ajoutée à la concentration finale de 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 0.2 mM pour chaque dNTP, 25 unités / mL iTaq™ ADN polymérase, 3 mM MgCl₂, SYBR™ Green I, 10 nM fluorescéine, et stabilisée

dans de l'eau distillée stérile. Les amorces de chaque gène étudié (P0, Flt-1, KDR, MMP-1, MMP-13, TIMP-1, vWF, FT, tPA, PAI-1) sont ajoutées à la concentration finale de 200 nM. Leurs séquences sont données dans le Tableau 3. Les données sont analysées par le logiciel iCycler IQ™ et comparées par la méthode des $\Delta\Delta C_t$. Chaque expérience a été réalisée en « triplicate ». Les résultats sont exprimés relativement au temps 6h et par rapport aux HOPs ou HUVECs qui est standardisé à 1. Trois expériences indépendantes ont été réalisées et analysées statistiquement par le test *t Student* (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

Tableau 3. Séquences des amorces utilisées en Q-PCR.

Gène	Séquences des amorces	TM (°C)	GenBank
Flt-1	sens 5' CAGGCCAGTTTCTGCCATT 3' anti-sens 5' AAGGTCGAGTCGCACCAGCAT 3'	65	AF063657
FT	sens 5' AGA AAG GCA GGA GTG GGG CAG 3' anti-sens 5' TCC AGG GTC TTC ATG CTC CGA 3'	65	BC_011029
KDR	sens 5' CCAGCAAAAGCAGGGAGTCTGT 3' anti-sens 5' ACAGACACAGTAGCCTCACTATAGG 3'	62	AF063658
MMP-1	sens 5' GCTGGGAGCAAACACATCTGA 3' anti-sens 5' GGCTTTCTCAATGGCATGGTC 3'	58	NM_002421
MMP-13	sens 5' AACATCCAAAACGCCAGAC 3' anti-sens 5' GGAAGTTCTGGCCAAAATGA 3'	63	NM_002427
P0	sens 5' ATGCCAGGGAAGACAGGGC 3' anti-sens 5' CCATCAGCACCACAGCCTTC 3'	65	BC015690
PAI-1	sens 5' TGT TTG TCT GCG GCG ATG TTA 3' anti-sens 5' GTA TGC GGC TTG TCA CCT CCT 3'	64	BC010860
TIMP-1	sens 5'AGACACCAGAGAACCCACCAT 3' anti-sens 5'CTATCAGCCACAGCAACAACA 3'	62	NC_000023.9
tPA	sens 5' ATC CCG CCT CTT CTT CTT CAG 3' anti-sens 5' GCA CTC TTC CCT CTC CTG TAG 3'	62	NC_000008.9
vWF	sens 5' CCC CTG AAG CCC CTC CTC CTA 3' anti-sens 5' ACG AAC GCC ACA TCC AGA ACC 3'	65	NC_000012.10

Western Blot

Les cellules (HOP, HUVEC et co-cultures) sont cultivées pendant 6, 24 ou 48 heures et sont récupérées par traitement à la trypsine 0,2 % (p/v) contenant 5 mM de EDTA. Puis, les cellules sont lavées avec du PBS contenant des inhibiteurs de protéases : 10 $\mu\text{g/mL}$ de leupeptine, 10 $\mu\text{g/mL}$ d'aprotinine et 1 mM de phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Les cellules sont lysées dans un tampon composé de 50 mM Tris-HCl, pH8, 150mM de NaCl, 1% (v/v) de NP-40, 10 $\mu\text{g/mL}$ d'aprotinine, 10 $\mu\text{g/mL}$ de leupeptine et 1 mM de PMSF, à 4°C sous agitation. Les lysats sont centrifugés à 20 000 g pendant 20 min à 4°C. Les protéines sont dosées par la méthode du BCA (bicinchoninic acid) (Pierce, Perbio Science, Bezons, France) et 30 μg de protéines de chaque échantillon sont déposés dans les puits d'un gel d'électrophorèse composé de sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (10%) puis transférés sur une membrane de polyvinylidene difluoride (Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA). Les sites non spécifiques sont saturés par incubation de la membrane pendant 1h avec un tampon Tris-buffered saline–Tween (TBS-T: 20 mM, Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) supplémenté avec 5% (p/v) de lait écrémé.

Les anticorps spécifiques anti- β -caténine (lapin, dilué au 1/1000^{ème}, CST), et anti- α -tubuline (souris, 1/20000^{ème}, Sigma) sont utilisés pour détecter les protéines sur la membrane. Puis, la membrane est incubée en présence des anticorps secondaires anti-IgG de souris ou de lapin liés à une peroxydase (HRP, 1/5000^{ème}, Chemicon, Euromedex, France). Après lavage au TBS-T, la membrane est incubée avec un agent de détection de la luminescence (ECL, Amersham, Biosciences, France) puis révélée grâce à son exposition à un film photographique. L'intensité des bandes a été quantifiée par le logiciel National Institute of Health 1.62 permettant d'exprimer l'intensité des bandes des protéines phosphorylées par rapport à celle des bandes des mêmes protéines non-phosphorylées.

Annexe 2

Signal transduction and procoagulant state of human cord blood-progenitor-derived endothelial cells after Interleukin-1 α stimulation

**Richard Daculsi, Murielle Rémy-Zolghadri, Maritie Grellier, Véronique Conrad,
Philippe Fernandez, Reine Bareille, Laurence Bordenave**

Endothelium, 14 :163 :171, 2007

This article was downloaded by:[SCD - Universite Bordeaux 2]
On: 15 October 2007
Access Details: [subscription number 773444277]
Publisher: Informa Healthcare
Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954
Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Endothelium

Journal of Endothelial Cell Research

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smp/title~content=t713617829>

Signal Transduction and Procoagulant State of Human Cord Blood - Progenitor-Derived Endothelial Cells after Interleukin-1 α Stimulation

Richard Daculsi^{ab}, Murielle Rémy-Zolghadri^b, Maritie Grellier^a, Véronique Conrad^c, Philippe Fernandez^{ab}, Reine Bareille^a, Laurence Bordenave^{ab}

^a INSERM, U.577, Bordeaux, France

^b Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, France

^c CNRS, UMR 5164, Bordeaux, France

Online Publication Date: 01 May 2007

To cite this Article: Daculsi, Richard, Rémy-Zolghadri, Murielle, Grellier, Maritie, Conrad, Véronique, Fernandez, Philippe, Bareille, Reine and Bordenave, Laurence (2007) 'Signal Transduction and Procoagulant State of Human Cord Blood - Progenitor-Derived Endothelial Cells after Interleukin-1 α Stimulation', Endothelium, 14:3, 163 - 171

To link to this article: DOI: 10.1080/10623320701421602

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/10623320701421602>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

Endothelium, 14:163–171, 2007
 Copyright © Informa Healthcare
 ISSN: 1062-3329 print/1029-2373 online
 DOI: 10.1080/10623320701421602

informa
 healthcare

Signal Transduction and Procoagulant State of Human Cord Blood—Progenitor-Derived Endothelial Cells after Interleukin-1 α Stimulation

Richard Daculsi

INSERM, U.577, Bordeaux, France; Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, France

Murielle Rémy-Zolghadri

Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, France

Maritie Grellier

INSERM, U.577, Bordeaux, France

Véronique Conrad

CNRS, UMR 5164, Bordeaux, France

Philippe Fernandez

INSERM, U.577, Bordeaux, France; Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, France

Reine Bareille

INSERM, U.577, Bordeaux, France

Laurence Bordenave

INSERM, U.577, Bordeaux, France; Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, France

Isolation of endothelial progenitors from human umbilical cord blood generated great hope in vascular tissue engineering. However, before clinical use, progenitor derived endothelial cells (PDECs) have to be compared with mature endothelial cells (ECs). The aim of this study was to explore the behavior of PDECs exposed to a proinflammatory cytokine (interleukin-1 α ; IL-1 α) according to the mitogen-activated protein (MAP) kinase and nuclear factor (NF)- κ B signal transduction pathways as well as procoagulant activity (PCA). CD34⁺ mononuclear cells were isolated using magnetic beads, cultured, and compared with human saphenous vein ECs (HSVECs). PDECs express endothelial markers: CD31, VE-cadherin, von Willebrand factor, KDR, and incorporate acetylated low-density lipoprotein (Dil-Ac-LDL). IL-1 α similarly activates c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) and p38 pathways in HSVECs and PDECs, whereas extracellular signal-related kinase (ERK)1/2

phosphorylation is lower in PDECs than in HSVECs. Low ERK1/2 phosphorylation in PDECs was specific to IL-1 α as vascular endothelial growth factor (VEGF) similarly stimulated ERK1/2 pathway. With respect to inhibitor of NF- κ B (I κ B) degradation, NF- κ B translocation and phosphorylation, the NF- κ B pathway is comparable in HSVECs and PDECs after stimulation. PCA and tissue factor level induced by IL-1 α are lower in PDECs than in HSVECs. Thus, our data show that PDECs display the characteristics of functional mature ECs under IL-1 α stimulation. However, we observed significant differences between PDECs and HSVECs related to both ERK1/2 pathway activation and tissue factor production.

Keywords Endothelial Progenitors, IL-1 α , Procoagulant Activity, Signal Transduction

Received 12 December 2006; accepted 25 April 2007.

This work was supported by grants from Etablissement Français des Greffes and CNRS SPI-INSERM: Programme IT2B (Ingénierie Tissulaire-Biomécanique-Biomatériaux). The authors thank P. Guitton for help with the figures.

Address correspondence to Laurence Bordenave, INSERM, U.577, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France. E-mail: laurence.bordenave@biophys.u-bordeaux2.fr

The isolation of endothelial progenitor cells (EPCs) from human peripheral and umbilical cord blood generated great hope in the fields of cellular therapies and regenerative medicine (Asahara et al. 1997). These precursors proved to be of particular benefit in animal models as well as in clinical studies after injection into the circulation or at the site of injury in the case of ischemic vascular diseases. The outlook for EPC-based therapy for cardiovascular disease thus looked promising (Hristov and Weber 2004; Werner and Nickenig 2006; Zhang et al. 2006).

It has now been clearly established that *in vivo* EPCs originate from bone marrow where they express CD133 at an early stage and a fraction of them also express CD34 and Flk1/KDR/vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (Peichev et al. 2000; Reyes et al. 2002). When mobilized by cytokines, EPCs leave this compartment and join the bloodstream where they progressively differentiate by losing CD133 while expressing vascular-endothelial cadherin (VE-cadherin) and later on CD31 and von Willebrand factor (vWF) (Peichev et al. 2000; Quirici et al. 2001). Cells isolated from bone marrow or blood using the previously mentioned markers, CD133 in bone marrow (Quirici et al. 2001; Reyes et al. 2002) and CD34 or Flk1 in blood (Asahara et al. 1997; Bompais et al. 2004), can differentiate *in vitro* when cultured in the presence of cytokines and growth factors, amongst which VEGF has clearly been identified as an inducer of proliferation and differentiation (Ferrara 2001). To characterize the EPCs, investigators have explored markers of endothelial cell phenotype (Asahara et al. 1997; Gehling et al. 2000; Quirici et al. 2001) and some functional properties: induction of E-selectin in response to interleukin (IL)-1, expression of endothelial cell receptors or adhesion molecules upon tumor necrosis factor- α (TNF α) stimulation, vasomotor function, tissue repair, production of nitric oxide, and formation of capillary tubes (Bompais et al. 2004; Friedrich et al. 2006; He et al. 2004; Hur et al. 2004; Peichev et al. 2000; Quirici et al. 2001).

Endothelial cells (ECs) are continuously exposed *in vivo* to mechanical and biochemical (VEGF, IL-1, TNF α , etc.) stimuli, which are important modulators of vascular cell functions (permeability, hemostasis, vascular tone, inflammatory/immune response), growth, and structure, at both the protein and mRNA levels. In particular, the responses induced by proinflammatory cytokines (TNF, IL-1) are mediated through regulation of the three main members of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family: extracellular signal-regulated kinases (ERKs), c-Jun N-terminal protein kinase (JNK), and p38, and also through the nuclear transcription factor NF- κ B (Collins et al. 1995; May et al. 1998).

Exposure of ECs to proinflammatory cytokines also results in the release of inflammatory and chemotactic cytokines, the enhancement of leukocyte recruitment via expansion of adhesion molecules, and the loss of anticoagulant EC surface phenotype related to production and up-regulation of tissue factor (TF) surface expression supporting the extrinsic coagulation pathway (Bevilacqua et al. 1984; Kirkpatrick et al. 1997; Mantovani et al. 1998).

To our knowledge, little information is available concerning signal transduction in EPCs consecutively to a proinflammatory cytokine activation. Only recently, it has been reported that TNF α and glucose induce in EPCs the activation of the p38 MAP kinase, in association with a reduction in cell proliferation (Kuki et al. 2006; Seeger et al. 2005). Thus, the aim of our study was to improve knowledge of the behavior of EPCs under pathophysiological stimuli (IL-1). For this purpose, we isolated EPCs from human umbilical cord blood and induced *in vitro* their

differentiation in order to obtain progenitor-derived endothelial cells (PDECs). Their behavior was evaluated by comparison with that of human saphenous vein endothelial cells (HSVECs). We analyzed the MAP kinase pathway and determined the involvement of the NF- κ B transcription factor in the cells activated by IL-1 α ; we also assessed the capacity of activated cells to express TF, the initiator of the coagulation cascade.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and Culture of EPCs from Umbilical Cord Blood and of HSVECs

Human umbilical cord blood samples were collected from donors following French legislation. Isolation of EPCs was performed according to the procedure described by Bompais et al. (2004) with some modifications. In short, mononuclear cells were separated on lymphocytes separation medium (density 1.077; Eurobio, Les Ulis, France) and the collected cells seeded in a culture flask in RPMI 1640 (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) for 2 to 4 h. Then, the nonadherent fraction was collected and the CD34⁺ cells were isolated using magnetic beads according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Paris, France). The selected CD34⁺ cells were seeded on gelatin-coated flasks in an EGM-2-MV BulletKit medium (Cambrex, Emerainville, France). Clusters of endothelial cells appeared after approximately 7 to 10 days and the cells were classically amplified up to passages 6 to 10. For further experiments comparing HSVECs and PDECs, the latter were transferred to M199 supplemented with 20% FCS, 50 IU/mL heparin (Sanofi Synthelabo, Paris, France), 10 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF) (Sigma), and 50 μ g/mL gentamycin (Sigma), hereafter referred to as complete medium. Mature endothelial cells from human saphenous veins, collected after surgical coronary bypasses following French legislation, were isolated as previously described by Fernandez et al. (2006). Cells from passages 3 to 6 were used.

Cell Characterization

For immunofluorescent staining, cells were fixed with 1% paraformaldehyde (PFA), permeabilized with phosphate-buffered saline (PBS)–2% bovine serum albumin (BSA)–0.1% NP40, blocked in PBS–2% BSA–0.01% glycine and sequentially incubated with primary antibodies against vWF (Dako, Glostrup, Denmark), Flk-1, and NF- κ B p65 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and with the appropriate secondary antibodies labeled with Alexa 488 (10 μ g/mL; Molecular Probes, Cergy Pontoise, France). To detect acetylated low-density lipoprotein (Ac-LDL) uptake, cells were incubated with 10 μ g/mL of Dil-Ac-LDL (Arbor Bio-Products, Norwood, MA) for 24 h before being fixed with 1% PFA. Images were shot using the 40 \times objective lens in a fluorescent Zeiss Axiovert 25 microscope (Seli, Toulouse, France) equipped

with an Olympus DP70 camera (Seli) and using the Analysis software program provided by Soft Imaging System (Münster, Germany).

For fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis, cells were detached by a quick treatment with trypsin (0.125%)–EDTA (0.0625%). Cells were incubated with mouse monoclonal phycoerythrin (PE)-conjugated antibodies against CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule [PECAM]) (clone 1F11) and VE-cadherin (clone TEA 1/31) from Beckman Coulter (Roissy, France). Cells were incubated with isotype-matched (IgG1) immunoglobulin coupled with PE fluorochrome as a negative control. Analysis was performed using a fluorescence-activated cell sorter (EPICS XL flow cytometer; Coulter, FL) and the Expo 32TM Acquisition and Analysis software (Beckman Coulter).

Cell Viability and Proliferation Assays

First, confluent cells were rendered quiescent with 16 h of starvation in M199 containing 10% FCS. Cells were left untreated or treated for 30 min or 4 h with IL-1 α (5 ng/mL), then cell viability and mortality were determined with the LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit, according to the manufacturer's protocol (Molecular Probes). About 500 cells were observed. Second, cell proliferation was evaluated by using the neutral red uptake as described by Lowik et al. (1993). Briefly, cells were plated on 48-well plates and cultured in complete medium as described in methods in the presence or not of IL-1 α as above. After 72 h of incubation and washing, vital dye neutral red (0.05%; Sigma) was added to wells. After an additional 3 h of incubation and washing, the incorporated dye is liberated from the cells in an acidified ethanol solution (1% acetic acid in 50% ethanol). The absorbance was measured with a spectrophotometer at 540 nm (DYNEX, MRX; Thermolab système, Cergy Pontoise, France) and ratios of absorbance were established for HSVECs and PDECs in comparison with their matched controls (absence of IL-1 α).

Immunoblotting Procedure

Endothelial cells seeded (60,000 cells/cm²) in a 25-cm² flask were rendered quiescent with 16 h of starvation in M199 containing 10% FCS, followed by 3 h of incubation in M199 containing 0.2% BSA. Cells were left untreated or treated with IL-1 α (Biosource International, CA) or VEGF (R&D Systems, Abingdon, UK) as described in the figure captions. Treatments were terminated by washing the cells with ice-cold PBS containing phosphatase inhibitors (10 mM NaF and 2 mM sodium orthovanadate). Cells were then recovered by treatment with trypsin–EDTA–containing phosphatase inhibitors. Thereafter, cells were washed in cold PBS with 10 mM NaF, 2 mM sodium orthovanadate, 10 μ g/mL leupeptin, 10 μ g/mL aprotinin, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). They were lysed in buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.7, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 5 mM β -mercaptoethanol, 10 μ g/mL apro-

tinin, 10 μ g/mL leupeptin, 2 mM sodium orthovanadate, 10 mM NaF, and 1 mM PMSF at 4°C with gentle agitation. Lysates were clarified by centrifugation at 20,000 \times g for 20 min at 4°C. The protein content of cell lysates was measured using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce, Perbio Science, Bezons, France) and equal quantities of protein (40 μ g/lane) were resolved by sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (10%) and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA). Membranes were blocked for 1 h in Tris-buffered saline–Tween (TBS-T: 20 mM, Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) with 5% nonfat dry milk. Blots were incubated overnight at 4°C in TBS-T/5% nonfat dry milk containing rabbit polyclonal anti-MAP kinase ERK1/2 from Upstate Biotechnology (Mundolsheim, France); anti-phospho-p38 MAP kinase, anti-p38 MAP kinase, anti-stress-activated protein kinase (SAPK)/JNK, anti-phospho-NF- κ B p65 (Ser 536) antibodies from Cell Signaling Technology (Beverly, MA); anti-NF- κ B p65, anti-I κ B α from Santa Cruz Biotechnology; mouse monoclonal anti-phospho-p44/42 MAP kinase, anti-phospho-SAPK/JNK antibodies from Cell Signaling Technology; and anti- α tubuline antibody from Sigma. Then blots were washed in TBS-T and incubated in TBS-T/5% nonfat dry milk containing horseradish peroxidase–conjugated goat anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG for 1 h at room temperature. Finally, the blots were further washed in TBS-T and the immunoreactive bands visualized using ECL-plus reagents (Amersham, Biosciences, Orsay, France). In experiments using phosphospecific antibodies, membranes were further stripped using the Re-Blot Plus solution (Chemicon International, Temecula, CA) in order to reblot for detection of the total specific corresponding protein. The intensity of immunoreactive bands was analyzed using the National Institutes of Health 1.62 image analyzer software, which can express results as a ratio of specific phosphorylated proteins to unphosphorylated proteins.

Procoagulant Activity (PCA) Assessment and Tissue Factor (TF) Measurement

Measurement of procoagulant activity was performed using a plasma recalcification time assay. Cultures of confluent cells were stimulated or not with IL-1 α (5 ng/mL in the presence of 1% FCS) for 4 h before harvesting cells by scraping in PBS. Protein content was measured as described above and the samples were frozen until use. For the PCA assessment, samples were rapidly thawed at 37°C, centrifuged for 5 min at 400 \times g and 20°C. The resulting pellet was resuspended in a Tris buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 100 mM, BSA 0.1%) to obtain a concentration of 100 μ g of proteins/mL. Thus, 100 μ L of the samples were added to 100 μ L of a pool of standard plasmas and incubated at 37°C for 3 min before the addition of a magnetic stirrer and of 100 μ L of warmed CaCl₂ (25 mM). The clotting time was determined in a coagulation apparatus (KC10; Amelung, Germany) and corresponded to the time between the

addition of CaCl₂ and the immobilization of the stirrer. All the clotting assays were carried out in triplicate. PCA was characterized as TF using commercially available plasmas deficient of factors VII and X (Diagnostica Stago, Asnières, France). Finally, TF antigen levels were measured in cell lysates. For this purpose samples were thawed, centrifuged, and the pellet resuspended in Tris-HCl 50 mM pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1% Triton X100 before measurement using a commercially available IMUBIND Tissue Factor ELISA kit (American Diagnostica, Stamford, CT).

Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm SD. The Mann-Whitney *U* test was used for intergroup comparisons. A *p* value of $<.05$ was considered to be statistically significant.

RESULTS

CD34⁺ Mononuclear Cells Differentiate into a Typical Endothelial Morphology

Selected CD34⁺ mononuclear cells adhered to the culture support within the first week (7.9 ± 1.5 days, $n=10$) as small clusters of cells that rapidly proliferated in EGM-2-MV Bullet Kit medium. The average number of clusters was 5 ± 2.3 clusters ($n=12$) from 5×10^5 CD34⁺ seeded cells. When amplified in the above medium, 12 millions of cells were obtained after 3 weeks in culture. We amplified them up to passage 10. Cells were cryopreserved and thawed for experiments.

In culture, these cells displayed the typical morphology of mature ECs with the distinct cobblestone pattern. When compared with mature HSVECs, both cell types expressed CD31, VE-cadherin, vWF, and VEGF receptor 2 (Flk-1) and incorporated Dil-Ac-LDL at the same level (Figure 1). Because these differentiated cells were identified as ECs, they were tested for the functional features of ECs in comparison with HSVECs.

IL-1 α Has No Effect on Cell Viability or Proliferation

As it has been previously reported (Cuzzolino et al. 1990; de Klaver et al. 2002) that IL-1 could induce cell death and

inhibit endothelial cell proliferation, we performed experiments to determine whether IL-1 α has such effect in our experimental conditions; i.e., after 30 min or 4 h of incubation on cell viability or up to 3 days of treatment on cell proliferation. In those conditions, IL-1 α did not induce cell death and did not modify cell proliferation in both cell types (data not shown).

IL-1 α Induces a Differential Activation of the ERK1/2 Pathway in PDECs

As the biological effects of the proinflammatory cytokine IL-1 α involve different MAP kinase pathways, we analyzed the activation of ERK1/2, p38, and JNK in HSVECs and PDECs by immunoblot analysis. Cells were activated for 30 min with IL-1 α (5 ng/mL). As shown in Figure 2A, ERK1/2 was strongly activated by IL-1 α in HSVECs and weakly in PDECs ($p < .01$ and $p < .03$, respectively). The densitometric analysis of five independent experiments statistically showed that the activation was lower in PDECs than in HSVECs ($p < .05$). In contrast, the "stress-activated kinases" p38 (Figure 2B) and JNK (Figure 2C) were activated at the same level in HSVECs and PDECs.

To examine whether the low ERK1/2 phosphorylation in PDECs could be IL-1-specific and not a result of a deficiency in the ERK1/2 pathway, we activated the cells with VEGF. Indeed, VEGF is known to induce ERK1/2 phosphorylation, a requirement for endothelial cell proliferation upon this growth factor (Yu and Sato 1999). For this purpose, cells were stimulated for 10 min with 10 ng/mL of VEGF. In both cell types, we observed a comparable phosphorylation level of ERK1/2, with no statistical difference whatever the cell origin (Figure 3). We concluded that the ERK1/2 phosphorylation pathway is functional but weakly involved in PDECs in comparison to HSVECs after IL-1 stimulation.

IL-1 α Activates the NF- κ B Pathway to a Similar Extent in PDECs and HSVECs

In unstimulated cells, the majority of NF- κ B resides in the cytoplasm in an inactive form, due to its association with the inhibitory proteins known as inhibitors of NF- κ B (I κ Bs). Following stimulation with IL-1, a crucial regulatory control point

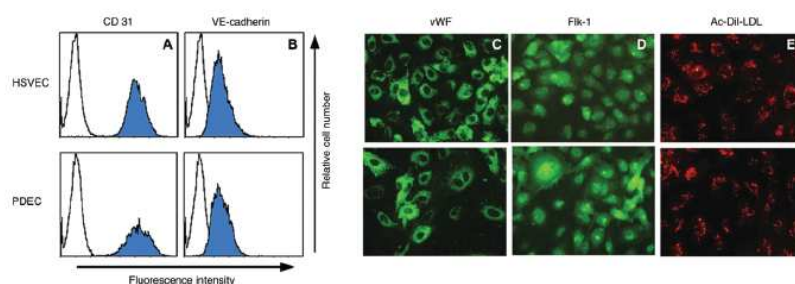


FIG. 1. PDECs express typical markers of mature HSVECs. For immunocytofluorescent assessments, cells were either detached (FACS analysis: A, B) or not (in situ staining: C, D, E) from the culture support and marked with the specific antibodies (A, B, C, D) or Dil-Ac-LDL (E). Plots of CD 31 (A) and VE-cadherin (B) versus isotype control curves; vWF (C) and Flk-1 (D) stainings of adherent cells and uptake of Dil-Ac-LDL by the cells in culture (E).

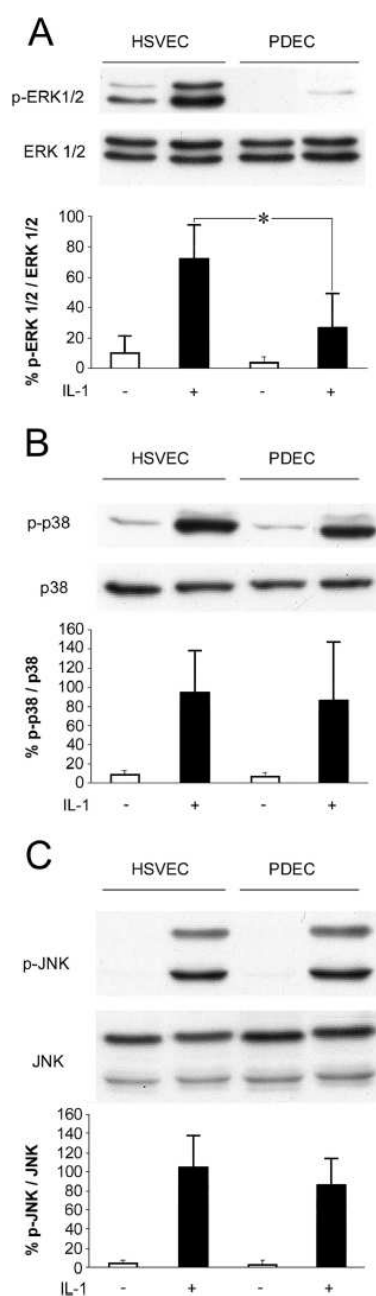


FIG. 2. IL-1 α induces MAP kinase activation in HSVECs and PDECs. HSVECs and PDECs were bFGF and serum starved and either untreated or treated with IL-1 α (5 ng/mL) for 30 min. Cell lysates were analyzed by probing Western blot with anti-phosphorylated MAP kinase antibodies. For loading control, blots were stripped and reprobed with anti-unphosphorylated MAP kinase antibodies: ERK1/2 (A), p38 (B), and JNK (C). Graphs represent the densitometric analysis of the corresponding Western blots by determination of the ratio of phosphoprotein to protein using the NIH 1.62 image analyzer software. Values are means \pm SD of five separate experiments. * p < .05.

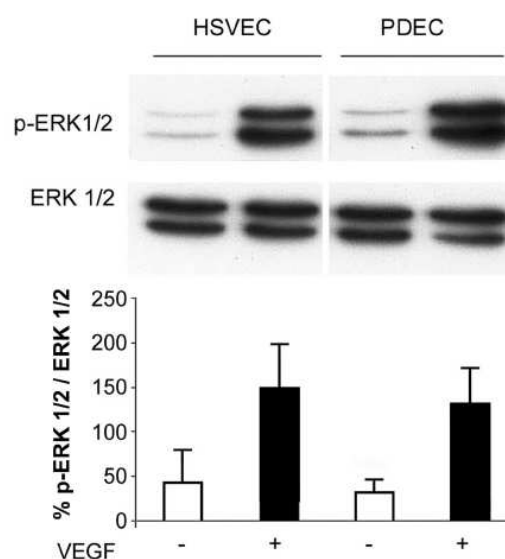


FIG. 3. VEGF induces ERK1/2 activation in HSVECs and PDECs. HSVECs and PDECs were bFGF and serum starved and either untreated or treated with VEGF (10 ng/mL) for 10 min. Cell lysates were analyzed by probing Western blot with anti-phosphorylated ERK1/2 antibody. For loading control, blot was stripped and reprobed with anti-unphosphorylated ERK1/2 antibody. Graph represents the densitometric analysis of the corresponding Western blot by determination of the ratio between phospho-ERK1/2 to ERK1/2. Values are means \pm SD of three separate experiments.

on the pathway to NF- κ B is the phosphorylation and subsequent degradation of I κ Bs (especially I κ B α). The dissociation of NF- κ B from I κ B results in translocation of NF- κ B to the nucleus where it activates transcription of specific target genes (Li and Verma 2002). To evaluate this pathway, we stimulated cells with IL-1 α 5 (ng/mL, 30 min) and analyzed the I κ B degradation in both HSVECs and PDECs by Western blot analysis using an antibody that recognized I κ B α . We standardized the amount of detected I κ B α to that of α -tubulin. As shown in Figure 4A, stimulation with IL-1 α resulted in I κ B α degradation in both HSVECs and PDECs, with no statistical difference in the amount of initial and remaining I κ B α after IL-1 stimulation between the cell types. We also ensured, by immunostaining of the p65 subunit of NF- κ B, that NF- κ B was mainly distributed in the cytoplasm of unstimulated cells (Figure 4B, a, c), but mostly translocated to the nucleus after 30 min of IL-1 α treatment (Figure 4B, b, d). Thus, the response of I κ B was correlated to the NF- κ B translocation, with no significant difference dependent on the origin of tested endothelial cells. Accumulated evidence has shown that after IL-1 stimulation, I κ B degradation followed by release and nuclear translocation of NF- κ B, are not sufficient to induce NF- κ B dependent gene expression (Bergmann et al. 1998). A second regulatory mechanism independent of I κ B degradation is involved in the regulation of the transcriptional activity through the phosphorylation of the p65 subunit

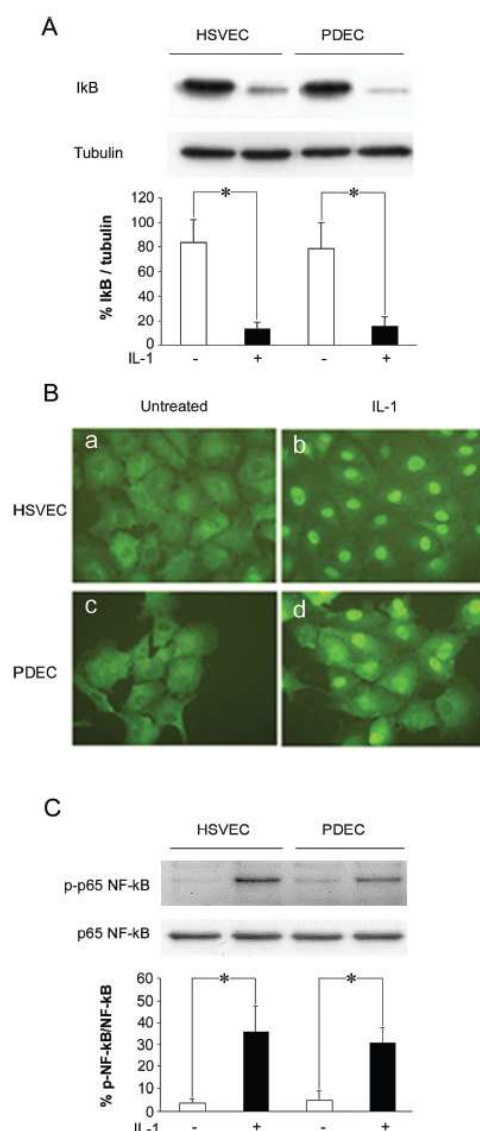


FIG. 4. IL-1 α induces I κ B α degradation and NF- κ B translocation. HSVECs and PDECs were bFGF and serum starved and either untreated or treated with IL-1 α (5 ng/mL) for 30 min. (A) Cell lysates were analyzed by probing Western blot with polyclonal anti-I κ B α antibody. For loading control, blots were stripped and reprobed with monoclonal anti- α -tubulin antibody. Values are means \pm SD following normalization to α -tubulin ($n = 4$); $p < .05$. (B) IL-1 α -treated (b, d) or untreated (a, c) HSVECs and PDECs were fixed and immunostained with rabbit polyclonal anti-NF- κ B antibody followed by Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit IgG. The subcellular distribution of NF- κ B was observed under a fluorescence microscope. (C) Cell lysates were analyzed by probing Western blot with anti-phospho-p65 NF- κ B polyclonal rabbit antibody. For loading control, the blots were stripped and reprobed with anti-p65 polyclonal rabbit antibody. Graph represents the densitometric analysis of the corresponding Western blot by determination of the ratio of phospho-p65 NF- κ B to p65. Values are means \pm SD of four separate experiments following normalization for total p65 NF- κ B; $*p < .05$.

by a large variety of kinases at different sites (Vermeulen et al. 2003). We analyzed one of those phosphorylated sites. Figure 4C shows that phosphorylation of serine 536 on the p65 subunit of NF- κ B occurs in HSVECs and PDECs after IL-1 α stimulation, with no significant difference between cell types. Taken together, these results indicate that with respect to I κ B degradation, to NF- κ B translocation to the nucleus and to NF- κ B phosphorylation, the NF- κ B pathway is comparable in HSVECs and PDECs after stimulation with IL-1 α .

IL-1 α Induces Tissue Factor Activity in PDECs

We measured the procoagulant activity on the basis of TF to activate factor VII, which in turn activates factor X. Basal surface expression of TF activity in both HSVECs and PDECs expressed as clotting times were 135 ± 22 and 168 ± 19 s (mean \pm SD, $n = 7$), respectively ($p < .03$). Both HSVECs and PDECs responded to IL-1 α (5 ng/mL, 4 h) by decreasing their clotting times: 30 ± 6 and 53 ± 5 s, respectively (significantly different, $p < .02$). Figure 5A shows a 4.8- and 3.2-fold shortening time for HSVECs and PDECs, respectively. A significant difference between both cell types is obtained upon cytokine stimulation: -33% , $p < .01$ for PDECs. The procoagulant activity was attributed to TF pathway induction because deficient plasmas in factors VII and X provided clotting times over 250 and 500 s, respectively, for both unstimulated cell types. Control experiments with normal plasma in the presence of cell supernatants, Tris buffer, and culture medium provided clotting times over 200 s. To determine whether the decrease in the procoagulant activity in PDECs compared with HSVECs was related to TF antigen content, TF protein levels in both cell lysates were quantified using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). As shown in Figure 5B, the quantity of TF antigen expressed in pg/mL of total cellular protein was drastically decreased in PDECs (-400% ; $p < .02$).

DISCUSSION

In the present study we explored some PDEC functional properties that have not been assessed elsewhere. This in vitro study is the first to (i) deal with signal transduction in these cells under IL-1 stimulation; (ii) compare PDECs' functional properties to those of ECs arising from human adult saphenous vein; and (iii) explore the ability of PDECs to initiate clot formation. All the studies that report isolation of EPCs and their subsequent phenotypical characterization were performed either without comparison with mature ECs (Bellik et al. 2005; Quirici et al. 2001; Shin et al. 2005) or by comparison with HUVECs (Bompais et al. 2004; Nowak et al. 2004; Peichev et al. 2000). When those cells are concerned by their use in tissue engineering, an analogy with their clinical counterpart is much more relevant. Along this line, HSVECs are good candidates because of their clinical application. It is now established that cells derived from EPCs express similar endothelial-specific markers of mature ECs at different levels, including Flk-1/KDR (VEGF-R2), Tie-1, Tie-2,

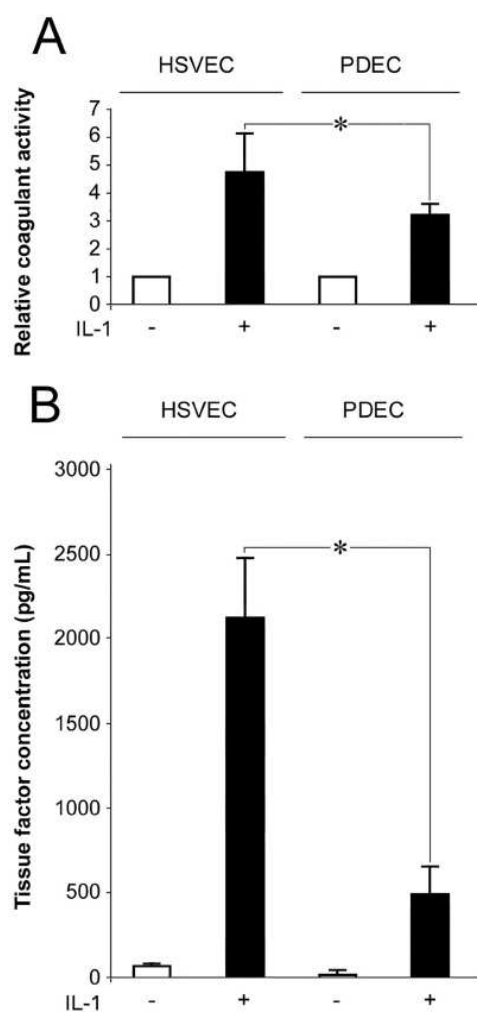


FIG. 5. IL-1 α induces coagulant activity and tissue factor production in HSVECs and PDECs. HSVECs and PDECs were bFGF and serum (1%) starved and untreated or treated with IL-1 α (5 ng/mL) for 4 h. (A) The coagulant activity was evaluated by a clotting assay as described in Materials and Methods. Results are expressed as the ratio of the coagulation time without IL-1 α to the coagulation time with IL-1 α . Values are means \pm SD of seven separate experiments. (B) Quantitative determination of human tissue factor with an enzyme-linked immunoassay (IMUBIN Tissue Factor ELISA kit). Values are means \pm SD of four separate experiments; * $p < .05$.

VE-cadherin, CD31, CD34, and vWF (Hristov and Weber 2004). They also have the typical cobblestone appearance of ECs and the ability to form cord and tubular-like structures in particular conditions (Bellik et al. 2005; Bompais et al. 2004; Neumuller et al. 2006; Shin et al. 2005). As expected, after cell culture and differentiation, we obtained PDECs expressing the main markers of mature endothelial cells (HSVECs); i.e., CD31, VE-cadherin, vWF, KDR, and Dil-Ac-LDL uptake.

To analyze the functional behavior of PDECs in comparison to that of HSVECs, we have chosen a widely implicated cytokine in the processes of tissue healing that also regulates the expression of numerous genes involved in physiology and pathophysiology of the vessels (Collins et al. 1995; Zhao et al. 2003): IL-1. For our study this cytokine presents the advantage to be implicated both in the MAP kinase and NF- κ B pathways and in the induction of the procoagulant tissue factor activity.

The cellular response to IL-1, after binding to its receptor (IL-1R), triggers signaling pathways derived from complex array of phosphorylations (Ichijo 1999; Kyriakis and Avruch 2001). One of those signaling pathways involves the MAP kinases. MAP kinases represent a family of serine/threonine kinases (ERK, JNK, p38 kinase), which have been proposed as important components linking extracellular stimuli to cellular responses in endothelial cells (Bogatcheva et al. 2003). A second signaling pathway is the NF- κ B/ κ B system that leads to phosphorylation, ubiquitination, and degradation of the inhibitor of NF- κ B (κ B), a protein that sequesters NF- κ B in cytoplasm by formation of a complex between both proteins when κ B is unphosphorylated. Upon release from κ B, NF- κ B translocates to the nucleus where it binds to a consensus sequence of several genes to initiate their expression (Li and Verma 2002). It should be stressed that MAP kinases may play a role in regulating NF- κ B transactivation, as well as other transcription factors constitutively present in the nucleus, in response to stimulation (Jefferies and O'Neill 2000).

In the present study, although IL-1 α activated the three major members of the MAP kinase pathway, ERK1/2, p38, and JNK, in both HSVECs and PDECs, we observed that the level of phosphorylated ERK1/2 was lower in PDECs than in HSVECs. This difference is specific to IL-1 α , as the response to VEGF depending on ERK phosphorylation was similar in both cell types. It is unlikely that the difference on ERK1/2 upon IL-1 stimulation could be related to a decrease in the expression level of the IL-1 receptor, as the response of the p38, JNK, and NF- κ B pathways are similar in PDECs and HSVECs. More obviously, the intracellular signal pathways leading to ERK1/2 activation by IL-1 may be different. Recently, Yashima et al. (2001) showed that the pathways leading to ERK1/2 activation after VEGF stimulation are heterogeneous (protein kinase C [PKC] dependent and/or Ras dependent) and vary according to the origin of the ECs. On the contrary, May et al. (1998) have shown that ERK1/2 activation by IL-1 is PKC independent and Ras dependent. To date, conflicting results have been reported about the role of Ras in ERK activation by VEGF (Takahashi et al. 1999). So it may be hypothesized that a defect in the Ras pathway in PDEC stimulated by IL-1 might explain the low ERK1/2 activation.

This study shows that the proinflammatory response of PDECs is similar to that of mature endothelial cells with respect to the NF- κ B pathway, which is essential for the expression of genes controlling adhesive molecules and interleukin expression (Collins et al. 1995; Li and Verma 2002). As ERK is a temporal

regulator of NF- κ B-dependent gene expression and because we show that ERK activation is lower in PDECs than in HSVECs, it should not be excluded that ERK differentially regulates IL-1-induced gene expression in PDECs and HSVECs (Jiang et al. 2004).

In contrast to others (Cuzzolino et al. 1990), we do not report that IL-1 α induces an inhibition of endothelial cell proliferation in presence of bFGF. It should be stressed that in our experimental conditions, cells were cultured with bFGF and heparin. Our results are not surprising because Minter et al. (1996) showed that bFGF and heparin protect endothelial cells from the effect of IL-1 (Minter et al. 1996).

Considering the procoagulant property displayed by cells, a comparable clotting time was obtained in basal conditions for PDECs and HSVECs. After IL-1 stimulation, we report that clotting times with HSVECs were significantly shortened after 4 h of incubation, as it has been reported in the literature for ECs or other cell types (Bevilacqua et al. 1984). Interestingly, we found that the clotting times displayed by PDECs after IL-1 stimulation were not comparable to that of HSVECs, because they were significantly decreased to a lesser degree (-33% , $p < .01$). Moreover, TF antigen content in PDECs was also markedly reduced (-400%). The discrepancy between the level of TF antigen and TF activity observed has been previously reported for human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in comparison with HSVECs: in spite of a similar level of TF antigen in both cell types, the TF activity was threefold more in HUVECs than in HSVECs (Grabowski et al. 1999). Recently, the expression of tissue factor expression measured by flow cytometry analysis after TNF stimulation was similar in HUVECs and EPCs derived from cord blood covering the inner layer of tissue-engineered living blood vessels, but the tissue factor activity was not evaluated in this report (Schmidt et al. 2006). About the difference between TF antigen and activity in our study, we cannot exclude that such variations could be attributed to the TF pathway inhibitor (TFPI) and/or nitric oxide production, which was not explored in our study. Grabowski et al. (2001) have reported that shear stress decreases EC TF activity by increasing secretion of TFPI, whereas Yank and Loscalzo (2000) have reported that TF expression and activity are reduced in endothelial cells in response to IL-1 by enhancing the production of nitric oxide. Whatever the involved mechanisms, such an attenuated procoagulant activity highlights functional differences between PDECs and HSVECs.

In conclusion, the overall purpose of this study was to assess functional properties of PDECs in response to IL-1 and to compare them to those of HSVECs. We can assume that cells display an appropriate EC phenotype with differences when regulatory mechanisms are involved. Our data contribute to an improvement of our knowledge in that they provide novel features for signal transduction and procoagulant activity of PDECs. Along this line, these cells could offer a solution to many problems remaining in vascular tissue engineering and cell transplantation for therapeutic application.

REFERENCES

- Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witztenbichler B., Schatteman G. and Isner J.M. (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, **275**, 964–967.
- Bellik L., Ledda F. and Parenti A. (2005) Morphological and phenotypical characterization of human endothelial progenitor cells in an early stage of differentiation. *FEBS Letters*, **579**, 2731–2736.
- Bergmann M., Hart L., Lindsay M., Barnes P.J. and Newton R. (1998) IkappaBalpha degradation and nuclear factor-kappaB DNA binding are insufficient for interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha-induced kappaB-dependent transcription. Requirement for an additional activation pathway. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 6607–6610.
- Bevilacqua M.P., Pober J.S., Majeau G.R., Cotran R.S. and Gimbrone M.A. Jr. (1984) Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *Journal of Experimental Medicine*, **160**, 618–623.
- Bogatcheva N.V., Dudek S.M., Garcia J.G. and Verin A.D. (2003) Mitogen-activated protein kinases in endothelial pathophysiology. *Journal of Investigative Medicine*, **51**, 341–352.
- Bompais H., Chagraoui J., Canon X., Crisan M., Liu X.H., Anjo A., Tolla-Le Port C., Leboeuf M., Charbord P., Bikfalvi A. and Uzan G. (2004) Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood*, **103**, 2577–2584.
- Collins T., Read M.A., Neish A.S., Whitley M.Z., Thanos D. and Maniatis T. (1995) Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB Journal*, **9**, 899–909.
- Cuzzolino F., Torcia M., Aldinucci D., Ziche M., Almerigogna F., Bani D. and Stern D.M. (1990) Interleukin 1 is an autocrine regulator of human endothelial cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 6487–6491.
- de Klaver M.J., Manning L., Palmer L.A. and Rich G.F. (2002) Isoflurane pretreatment inhibits cytokine-induced cell death in cultured rat smooth muscle cells and human endothelial cells. *Anesthesiology*, **97**, 24–32.
- Fernandez P., Daculsi R., Remy-Zolghadri M., Bareille R. and Bordenave L. (2006) Endothelial cells cultured on engineered vascular grafts are able to transduce shear stress. *Tissue Engineering*, **12**, 1–7.
- Ferrara N. (2001) Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, **280**, C1358–C1366.
- Friedrich E.B., Walenta K., Scharlau J., Nickenig G. and Werner N. (2006) CD34 $^{+}$ /CD133 $^{+}$ /VEGFR-2 $^{+}$ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. *Circulation Research*, **98**, e20–e25.
- Gehling U.M., Ergun S., Schumacher U., Wagener C., Pantel K., Otte M., Schuch G., Schafhausen P., Mende T., Kilic N., Kluge K., Schafer B., Hossfeld D.K. and Fiedler W. (2000) In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*, **95**, 3106–3112.
- Grabowski E.F., Carter C.A., Ingelfinger J.R., Tsukurov O., Conroy N., Abbott W.M. and Orkin R.W. (1999) Comparison of tissue factor pathway in human umbilical vein and adult saphenous vein endothelial cells: Implications for newborn hemostasis and for laboratory models of endothelial cell function. *Pediatric Research*, **46**, 742–747.
- Grabowski E.F., Reininger A.J., Petteruti P.G., Tsukurov O. and Orkin R.W. (2001) Shear stress decreases endothelial cell tissue factor activity by augmenting secretion of tissue factor pathway inhibitor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **21**, 157–162.
- He T., Smith L.A., Harrington S., Nath K.A., Caplice N.M. and Katusic Z.S. (2004) Transplantation of circulating endothelial progenitor cells restores endothelial function of denuded rabbit carotid arteries. *Stroke*, **35**, 2378–2384.
- Hristov M. and Weber C. (2004) Endothelial progenitor cells: Characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **8**, 498–508.
- Hur J., Yoon C.H., Kim H.S., Choi J.H., Kang H.J., Hwang K.K., Oh B.H., Lee M.M. and Park Y.B. (2004) Characterization of two types of endothelial

- progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **24**, 288–293.
- Ichijo H. (1999) From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene*, **18**, 6087–6093.
- Jefferies C.A. and O'Neill L.A. (2000) Rac1 regulates interleukin 1-induced nuclear factor kappaB activation in an inhibitory protein kappaBalpha-independent manner by enhancing the ability of the p65 subunit to trans-activate gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 3114–3120.
- Jiang B., Xu S., Hou X., Pimentel D.R., Brecher P. and Cohen R.A. (2004) Temporal control of NF-kappaB activation by ERK differentially regulates interleukin-1beta-induced gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 1323–1329.
- Kirkpatrick C.J., Wagner M., Hermanns I., Klein C.L., Kohler H., Otto M., van Kooten T.G. and Bittinger F. (1997) Physiology and cell biology of the endothelium: A dynamic interface for cell communication. *International Journal of Microcirculation Clinical and Experimental*, **17**, 231–240.
- Kuki S., Imanishi T., Kobayashi K., Matsuo Y., Obana M. and Akasaka T. (2006) Hyperglycemia accelerated endothelial progenitor cell senescence via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Circulation Journal*, **70**, 1076–1081.
- Kyriakis J.M. and Avruch J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews*, **81**, 807–869.
- Li Q. and Verma I.M. (2002) NF-kappaB regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, **2**, 725–734.
- Lowik C.W., Alblas M.J., van de Ruit M., Papapoulos S.E. and van der Pluijm G. (1993) Quantification of adherent and nonadherent cells cultured in 96-well plates using the supravital stain neutral red. *Analytical Biochemistry*, **213**, 426–433.
- Mantovani A., Garlanda C., Introna M. and Vecchi A. (1998) Regulation of endothelial cell function by pro- and anti-inflammatory cytokines. *Transplantation Proceedings*, **30**, 4239–4243.
- May M.J., Wheeler-Jones C.P., Houliston R.A. and Pearson J.D. (1998) Activation of p42mapk in human umbilical vein endothelial cells by interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha. *American Journal of Physiology*, **274**, C789–C798.
- Minter A.J., Keoshkerian E., Chesterman C.N. and Dawes J. (1996) Fibroblast growth factor and heparin protect endothelial cells from the effects of interleukin 1. *Journal of Cellular Physiology*, **167**, 229–237.
- Neumuller J., Neumuller-Guber S.E., Lipovac M., Mosgoeller W., Vetterlein M., Pavelka M. and Huber J. (2006) Immunological and ultrastructural characterization of endothelial cell cultures differentiated from human cord blood derived endothelial progenitor cells. *Histochemistry and Cell Biology*, **126**, 649–664.
- Nowak G., Karrar A., Holmen C., Nava S., Uzunel M., Hultenby K. and Sumitran-Holgersson S. (2004) Expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 or Tie-2 on peripheral blood cells defines functionally competent cell populations capable of reendothelialization. *Circulation*, **110**, 3699–3707.
- Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D., Zhu Z., Lane W.J., Williams M., Oz M.C., Hicklin D.J., Witte L., Moore M.A. and Rafi S. (2000) Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, **95**, 952–958.
- Quirici N., Soligo D., Caneva L., Servida F., Bossolasco P. and Delilieri G.L. (2001) Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *British Journal of Haematology*, **115**, 186–194.
- Reyes M., Dudek A., Jahagirdar B., Koodie L., Marker P.H. and Verfaillie C.M. (2002) Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *Journal of Clinical Investigation*, **109**, 337–346.
- Schmidt D., Asmis L.M., Odermatt B., Kelm J., Breymann C., Gossi M., Genoni M., Zund G. and Hoerstrup S.P. (2006) Engineered living blood vessels: Functional endothelia generated from human umbilical cord-derived progenitors. *Annals of Thoracic Surgery*, **82**, 1465–1471; discussion 1471.
- Seeger F.H., Haendeler J., Walter D.H., Rochwalsky U., Reinhold J., Urbich C., Rossig L., Corbaz A., Chvatchko Y., Zeiher A.M. and Dimmeler S. (2005) p38 mitogen-activated protein kinase downregulates endothelial progenitor cells. *Circulation*, **111**, 1184–1191.
- Shin J.W., Lee D.W., Kim M.J., Song K.S., Kim H.S. and Kim H.O. (2005) Isolation of endothelial progenitor cells from cord blood and induction of differentiation by ex vivo expansion. *Yonsei Medical Journal*, **46**, 260–267.
- Takahashi T., Ueno H. and Shibuya M. (1999) VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene*, **18**, 2221–2230.
- Vermeulen L., De Wilde G., Van Damme P., Vanden Berghe W. and Haegeman G. (2003) Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO Journal*, **22**, 1313–1324.
- Werner N. and Nickenig G. (2006) Clinical and therapeutic implications of EPC biology in atherosclerosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **10**, 318–332.
- Yang Y. and Loscalzo J. (2000) Regulation of tissue factor expression in human microvascular endothelial cells by nitric oxide. *Circulation*, **101**, 2144–2148.
- Yashima R., Abe M., Tanaka K., Ueno H., Shitara K., Takenoshita S. and Sato Y. (2001) Heterogeneity of the signal transduction pathways for VEGF-induced MAPKs activation in human vascular endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, **188**, 201–210.
- Yu Y. and Sato J.D. (1999) MAP kinases, phosphatidylinositol 3-kinase, and p70 S6 kinase mediate the mitogenic response of human endothelial cells to vascular endothelial growth factor. *Journal of Cellular Physiology*, **178**, 235–246.
- Zhang L., Yang R. and Han Z.C. (2006) Transplantation of umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cells: A promising method of therapeutic revascularisation. *European Journal of Haematology*, **76**, 1–8.
- Zhao B., Stavchansky S.A., Bowden R.A. and Bowman P.D. (2003) Effect of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on gene expression in human endothelial cells. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, **284**, C1577–C1583.

Annexe 3

Unusual transduction response of progenitor-derived and mature endothelial cells exposed to laminar pulsatile shear stress

Richard Daculsi, Maritie Grellier, Murielle Rémy, Reine Bareille, Dorothée Pierron, Philippe Fernandez, Laurence Bordenave

Journal of Biomechanics, 41 (2008) : 2781-2785



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Biomechanics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jbiomech
www.JBiomech.com



Short communication

Unusual transduction response of progenitor-derived and mature endothelial cells exposed to laminar pulsatile shear stress

Richard Daculsi^{a,*}, Maritie Grellier^a, Murielle Rémy^a, Reine Bareille^a, Dorothee Pierron^{a,b}, Philippe Fernandez^a, Laurence Bordenave^{a,c}

^a INSERM, U577, Bordeaux and Université Victor Segalen Bordeaux 2, UMR-S577, Bordeaux, F-33076, France

^b LEMI, Technopole Bordeaux-Montesquieu, Martillac F-33000, France

^c CIC-IT Biomatériaux, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

ARTICLE INFO

Article history:
Accepted 4 June 2008

Keywords:
Endothelial progenitor
Shear stress
Signal transduction

ABSTRACT

Progenitor-derived endothelial cells (PDECs) isolated from human umbilical cord blood generate a great hope in the fields of vascular tissue engineering. Endothelial cells subjected to shear stress convert mechanical stimuli into intracellular signals that affect cellular functions. It is essential to ensure that PDECs are able to sense shear stress as mature endothelial cells from human saphenous veins (HSVECs) do with mitogen-activated protein (MAP) kinase and nuclear factor (NF)- κ B signal transduction pathways. HSVECs and PDECs were seeded on glass slides coated with gelatin and exposed to 12 dyn/cm² in a parallel-plate flow chamber. In both cell types, shear stress activated extracellular signal-related kinase (ERK)1/2 with a rapid time course (maximum 5 min) followed by a reduced phosphorylation, and p38 pathway. c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) phosphorylation is observed only in PDECs. With respect to NF- κ B translocation to the nucleus, the NF- κ B pathway is not activated by flow in HSVECs and PDECs although interleukin-1 α (IL-1 α) activates this pathway in both cell types. In our experimental conditions, shear stress does not modify the nuclear translocation of NF- κ B in HSVECs after IL-1 α stimulation. It can be stated that PDECs are shear stress sensitive and capable of signal transduction as mature HSVECs are, despite the unusual transduction response of both cell types.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Vascular endothelial cells (ECs) are constantly exposed to shear stress that regulates EC functions through multiple sensing mechanisms, leading to the activation of signalling networks, which regulate functional responses (Li et al., 2005; Resnick et al., 2003).

In vascular tissue engineering, there is a need for a functional endothelial lining, responsive to the mechanical environment (Bordenave et al., 2005; Nerem, 2003). As nowadays adult stem cells such as endothelial progenitor cells (EPCs) arising from peripheral blood, cord blood or bone marrow might represent a potential source for an endothelial-type cell to be used in an engineered vascular substitute, it is crucial to explore whether their function is regulated by mechanical stimuli, in comparison to mature ECs (Kaushal et al., 2001; Shirota et al., 2003).

To our knowledge, this study is the first to explore the functional properties of progenitor-derived endothelial cells (PDECs) exposed to laminar pulsatile shear stress in terms of the

mitogen-activated protein (MAP) kinase and nuclear factor (NF)- κ B pathways that will modulate in turn ECs gene expression (Li et al., 2005). The MAPK family comprises essentially three members: extracellular signal-related kinase (ERK1/2), c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) and p38 known to be transiently activated in vitro by shear stress through phosphorylation. Thereafter, in the mechanotransduction process, phosphorylation leads to the activation of downstream transcriptional factors such as NF- κ B, also investigated in our study (Mohan et al., 1997; Hay et al., 2003).

2. Materials and methods

Human umbilical cord blood samples were collected from donors according to the French legislation and processed for EPC isolation and culture (Bompais et al., 2004). PDECs were characterized as endothelial cells by immunofluorescent stainings for von Willebrand factor, Flk-1, CD31 and VE-cadherin expression and acetylated low-density lipoprotein uptake (data not shown). Mature endothelial cells were isolated from human saphenous veins (HSVECs) (Fernandez et al., 2006).

For shear stress experiments, we used a parallel-plate culture flow chamber (Frangos et al., 1985). Briefly, a 7.5 × 3.8 cm glass slide coated with 0.2% gelatin was seeded (50,000 cells/cm²) with cells that formed in 4 days a confluent monolayer after starvation in M199 medium containing 10% FCS without basic fibroblast

* Corresponding author. Tel.: +33 5 57 57 11 90; fax: +33 5 56 90 05 17.
E-mail address: richard.daculsi@bordeaux.inserm.fr (R. Daculsi).

growth factor for 16 h. The glass slide formed the top of the flow chamber, which was created by sandwiching a silicone gasket between the glass slide and an acrylic plate. Shear stress experiments were carried out at 37 °C and the culture medium was buffered with HEPES (pH 7.4). Assuming Newtonian fluid behaviour, the laminar wall shear stress applied to the cells (12 dyn/cm²) was calculated with the following equation (Poiseuille law) $\tau = 6Q\mu/H^2w$, where Q is the flow rate, μ (0.008 poise) the viscosity of the medium, H (0.025 cm) the height and w (1.8 cm) the width of the flow chamber, and a 0.5 Hz pulsatile flow rate (0.28 mL/s) was generated by a peristaltic pump (Cobe Ströckert Instruments, München, Germany). The entrance length (1.8 cm) is very small compared to channel length (3.3 cm) in order to guarantee a parabolic profile over the length of the channel. Cells unsubmitted to shear stress served as static controls.

MAP kinase activation was evaluated by immunoblotting procedure as described previously (Fernandez et al., 2006). The intensity of immunoreactive bands was analysed and results were expressed as the ratio of specific

phosphorylated proteins to unphosphorylated proteins. NF- κ B activation was investigated by nuclear translocation of NF- κ B checked by immunofluorescent staining (Orr et al., 2005). Cells grown in 4-well plates and treated with 5 ng/mL interleukin-1 α (IL-1 α) (Biosource International, CA, USA) were used as positive controls.

The Mann–Whitney U test was used for intergroup comparisons. A P -value < 0.05 was considered significant.

3. Results and discussion

We applied a 12 dyn/cm² shear stress for 2, 5, 10 and 30 min on confluent PDECs in comparison with HSVECs; then we analysed

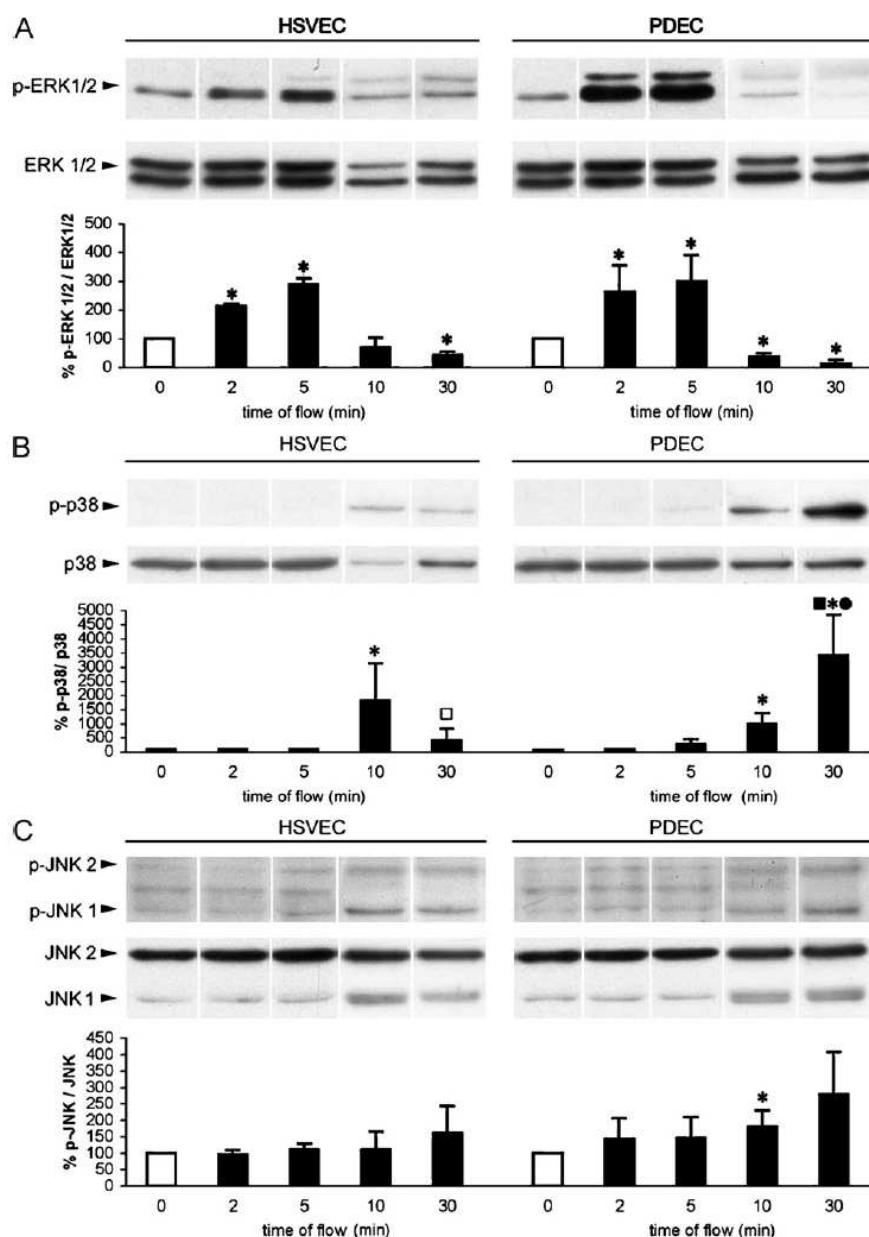


Fig. 1. Shear stress induces MAP kinase activation. Flow effect (12 dyn/cm²) on the phosphorylation of ERK 1/2 (A), p38 (B) and JNK (C) after 2, 5, 10 and 30 min. For each MAP kinase a representative Western blot of HSVECs and PDECs is presented. Relative levels of MAP kinase activation (shown on graph) are expressed as a percentage level of the static cells (100%). Values are means \pm SD of 3 separate experiments; *significant difference ($p < 0.05$) of flow versus static; □ HSVECs 30 min versus HSVECs 10 min, ● HSVECs 30 min versus PDECs 30 min, ■ PDECs 10 min versus PDECs 30 min.

the activation of ERK1/2, p38 and JNK by immunoblot analysis using antibodies that recognize specifically the phosphorylated and the unphosphorylated forms of the kinases. Shear stress modified neither the cell monolayer nor the cellular viability (data not shown). ERK1/2 were activated by flow with a similar time course in both cell types. The activation peaked at 5 min, but unexpectedly shear stress induced a rapid decrease in the activation of ERK1/2 compared with the static conditions (Fig. 1A). Shear stress strongly activates p38 phosphorylation in both cell types at 10 min. Whereas p38 phosphorylation decreases in HSVECs between 10 and 30 min, p38 phosphorylation significantly increases in PDECs during this time lapse (Fig. 1B). Concerning JNK pathway, shear stress does not modify phosphorylation in HSVECs (Fig. 1C), but increases phosphorylation as soon as 10 min in PDECs ($p < 0.05$).

Cellular response to shear stress through different mechanoreceptors incriminates a complex array of phosphorylation cascades (Li et al., 2005). As the MAP kinase pathway plays an essential role in endothelial cell function (Bogatcheva et al., 2003), their activation in PDECs by shear stress may be a way to determine whether their transduction mechanism is similar to that of mature adult ECs (HSVECs) and, therefore, to conclude about their potential to be used in vascular tissue engineering.

ERK1/2 have been usually reported to be activated by shear stress in a rapid and transient manner in ECs and to return to basal level later than 30 min (Azuma et al., 2000; Li et al., 2008; Osawa et al., 2002; Surapisitchat et al., 2001). We found that shear stress induces an activation peak of ERK1/2 at 5 min in PDECs as well as in mature ECs derived from saphenous vein, followed by a level of activation below the static conditions. This latter intriguing observation was also reported on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) at 10 min (Bao et al., 2000) and HSVECs at 30 min (Fernandez et al., 2006). In a recent paper, ERK1/2 activation peaked at 5 min, then returned to the basal levels later than 120 min (Kadohama et al., 2007). Shear stress activated p38 when it was applied for 10 min, as reported by others (Azuma et al., 2000; Surapisitchat et al., 2001), but p38 phosphorylation increases in PDECs with time, whereas it decreases in HSVECs. Concerning p38, activation occurs as early as the second minute, progressing to a maximal level at 5 min (Azuma et al., 2000), while others (Osawa et al., 2002) failed to demonstrate p38

activation over 30 min. In contrast, Surapisitchat et al. (2001) observed an increase in p38 phosphorylation between 10 and 60 min. According to JNK, we are able to show significant shear stress stimulation in PDECs but not in HSVECs. Contrasting results are reported in literature about the activation of the JNK: a delayed activation compared with ERK1/2 and p38 (Azuma et al., 2000; Jo et al., 1997; Li et al., 1996) or a failure of significant activation (Surapisitchat et al., 2001).

Stimulation of the NF- κ B/I κ B system leads to degradation of I κ B, a protein that sequesters NF- κ B in cytoplasm. Upon release from I κ B, NF- κ B translocates to the nucleus, where it binds to a consensus sequence of several genes to initiate their expression (Li and Verma, 2002). To test whether shear stress induced activation of the NF- κ B pathway, nuclear translocation of the NF- κ Bp65 was evaluated in cells after 30 min of flow conditions (12 dyn/cm²) by immunostaining. NF- κ B is mainly distributed in the cytoplasm of both cell types in static and flow conditions (Fig. 2A). These results are not in accordance with previous studies indicating that steady and pulsatile laminar shear stress stimulate the NF- κ B pathway (Bhullar et al., 1998; Hay et al., 2003; Mohan et al., 1997). However, laminar shear stress does not increase nuclear translocation in cells (Nagel et al., 1999) and preshearing (12 dyn/cm²) for 16 h suppressed the nuclear localization of constitutive NF- κ B (Partridge et al., 2007). Moreover, NF- κ B pathway activation seems dependent on the extracellular matrix composition (Orr et al., 2005). It should not be excluded that our contrary results according to NF- κ B translocation are related to the ECs origin (Bovine aortic endothelial cell, HUVEC), since flow differentially influences endothelial adhesion molecules and transcription factor expression, depending on the vascular bed origin (Methe et al., 2007). To evaluate if these unexpected results are related to our experimental conditions, two sets of experiments were performed. Firstly, both cell types were stimulated during 30 min with IL-1 α as the latter activates the NF- κ B pathway (Collins et al., 1995): NF- κ B was mainly localized in the cell nuclei of HSVECs and PDECs after IL-1 α treatment (Fig. 2B). Secondly, to evaluate whether shear stress modulates the NF- κ B pathway activation, HSVECs were stimulated or not by IL-1 α in static conditions or after shear stress (12 dyn/cm²) during 30 min. Shear stress does not modify NF- κ B translocation to the nucleus and HSVECs are able, following shear stress, to be responsive to

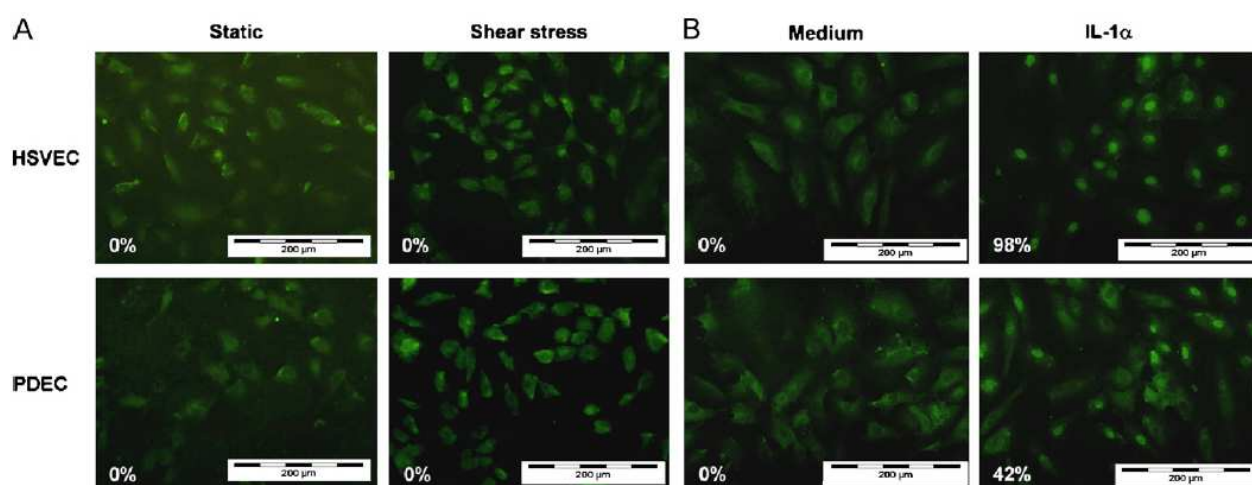


Fig. 2. NF- κ B localization by immunostaining on HSVECs and PDECs. Cells were fixed, permeabilized and stained successively with rabbit polyclonal antibody to NF- κ B (p65) and goat anti-rabbit secondary antibody labelled with Alexa 488. (A) Cells were maintained under static conditions (left) or exposed to shear stress (12 dyn/cm²) for 30 min (right). Staining was essentially localized in the cytoplasm whatever the cells and the treatment. (B) Cells were untreated or treated with IL-1 α (5 ng/mL) for 30 min. Numbers show percentage of cells with nuclei containing NF- κ B. Nuclear translocation of NF- κ B was observed in both cell types in the presence of IL-1 α but not in medium alone.

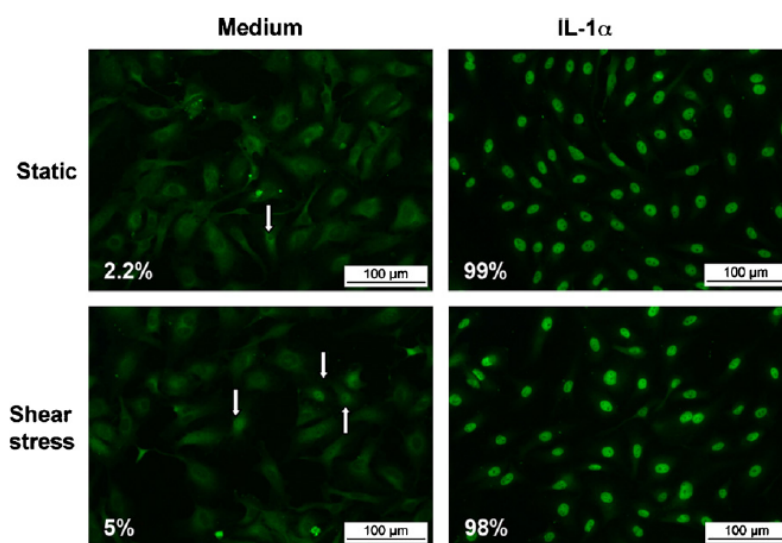


Fig. 3. Effect of shear stress on NF- κ B translocation induced by IL-1 α . Confluent HSVEC monolayers were kept as static controls or subjected to shear stress (12 dyn/cm²) for 30 min; afterwards cells were untreated or treated with IL-1 α for 30 min. After fixation and permeabilization, cells were stained with rabbit polyclonal antibody to NF- κ B (p65) and goat anti-rabbit secondary antibody labelled with Alexa 488. Numbers show percentage of cells with nuclei containing NF- κ B.

IL-1 α , as the percentage of translocation (98%) is comparable to that of unsheared cells (Fig. 3).

In conclusion, despite the unusual transduction response of both cell types, it can be stated that PDECs are shear-stress sensitive. These findings suggest that the use of PDECs in proposed clinical settings (cell therapy for vascular diseases and ischemic tissue, tissue engineering for vascular grafts, etc.) can at least guarantee their functionality towards capability to be activated under physiological stimulations.

Conflict of interest

None.

Acknowledgment

The authors thank P. Guittou for help with the figures.

References

- Azuma, N., Duzgun, S.A., Ikeda, M., Kito, H., Akasaka, N., Sasajima, T., Sumpio, B.E., 2000. Endothelial cell response to different mechanical forces. *Journal of Vascular Surgery* 32, 789–794.
- Bao, X., Clark, C.B., Frangos, J.A., 2000. Temporal gradient in shear-induced signaling pathway: involvement of MAP kinase, c-fos, and connexin43. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 278, H1598–H1605.
- Bhullar, I.S., Li, Y.S., Miao, H., Zandi, E., Kim, M., Shyy, J.Y., Chien, S., 1998. Fluid shear stress activation of IkappaB kinase is integrin-dependent. *Journal of Biological Chemistry* 273, 30544–30549.
- Bogatcheva, N.V., Dudek, S.M., Garcia, J.G., Verin, A.D., 2003. Mitogen-activated protein kinases in endothelial pathophysiology. *Journal of Investigative Medicine* 51, 341–352.
- Bompais, H., Chagraoui, J., Canron, X., Crisan, M., Liu, X.H., Anjo, A., Tolla-Le Port, C., Leboeuf, M., Charbord, P., Bikfalvi, A., Uzan, G., 2004. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood* 103, 2577–2584.
- Bordenave, L., Fernandez, P., Remy-Zolghadri, M., Villars, S., Daculsi, R., Midy, D., 2005. In vitro endothelialized ePTFE prostheses: clinical update 20 years after the first realization. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 33, 227–234.
- Collins, T., Read, M.A., Neish, A.S., Whitley, M.Z., Thanos, D., Maniatis, T., 1995. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappaB and cytokine-inducible enhancers. *FASEB Journal* 9, 899–909.
- Fernandez, P., Daculsi, R., Remy-Zolghadri, M., Bareille, R., Bordenave, L., 2006. Endothelial cells cultured on engineered vascular grafts are able to transduce shear stress. *Tissue Engineering* 12, 1–7.
- Frangos, J.A., Eskin, S.G., McIntire, L.V., Ives, C.L., 1985. Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* 227, 1477–1479.
- Hay, D.C., Beers, C., Cameron, V., Thomson, L., Flitney, F.W., Hay, R.T., 2003. Activation of NF-kappaB nuclear transcription factor by flow in human endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1642, 33–44.
- Jo, H., Sipos, K., Go, Y.M., Law, R., Rong, J., McDonald, J.M., 1997. Differential effect of shear stress on extracellular signal-regulated kinase and N-terminal Jun kinase in endothelial cells. G12- and Gbeta/gamma-dependent signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* 272, 1395–1401.
- Kadokama, T., Nishimura, K., Hoshino, Y., Sasajima, T., Sumpio, B.E., 2007. Effects of different types of fluid shear stress on endothelial cell proliferation and survival. *Journal of Cellular Physiology* 212, 244–251.
- Kaushal, S., Amiel, G.E., Guleserian, K.J., Shapira, O.M., Perry, T., Sutherland, F.W., Rabkin, E., Moran, A.M., Schoen, F.J., Atala, A., Soker, S., Bischoff, J., Mayer Jr., J.E., 2001. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nature Medicine* 7, 1035–1040.
- Li, Q., Verma, I.M., 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nature Reviews: Immunology* 2, 725–734.
- Li, Y.S., Shyy, J.Y., Li, S., Lee, J., Su, B., Karin, M., Chien, S., 1996. The Ras-JNK pathway is involved in shear-induced gene expression. *Molecular and Cellular Biology* 16, 5947–5954.
- Li, Y.S., Haga, J.H., Chien, S., 2005. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *Journal of Biomechanics* 38, 1949–1971.
- Li, L., Tataka, R.J., Natarajan, K., Taba, Y., Garin, G., Tai, C., Leung, E., Surapitschat, J., Yoshizumi, M., Yan, C., Abe, J., Berk, B.C., 2008. Fluid shear stress inhibits TNF-mediated JNK activation via MEK5-BMK1 in endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 370, 159–163.
- Methe, H., Balcells, M., Alegret Mdel, C., Santacana, M., Molins, B., Hamik, A., Jain, M.K., Edelman, E.R., 2007. Vascular bed origin dictates flow pattern regulation of endothelial adhesion molecule expression. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 292, H2167–H2175.
- Mohan, S., Mohan, N., Sprague, E.A., 1997. Differential activation of NF-kappaB in human aortic endothelial cells conditioned to specific flow environments. *American Journal of Physiology* 273, C572–C578.
- Nagel, T., Resnick, N., Dewey Jr., C.F., Gimbrone Jr., M.A., 1999. Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19, 1825–1834.
- Nerem, R.M., 2003. Role of mechanics in vascular tissue engineering. *Biorheology* 40, 281–287.
- Orr, A.W., Sanders, J.M., Bevard, M., Coleman, E., Sarembock, I.J., Schwartz, M.A., 2005. The subendothelial extracellular matrix modulates NF-kappaB activation by flow: a potential role in atherosclerosis. *Journal of Cell Biology* 169, 191–202.
- Osawa, M., Masuda, M., Kusano, K., Fujiwara, K., 2002. Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: is it a mechanoresponsive molecule? *Journal of Cell Biology* 158, 773–785.

- Partridge, J., Carlsen, H., Enesa, K., Chaudhury, H., Zakkar, M., Luong, L., Kinderlerer, A., Johns, M., Blomhoff, R., Mason, J.C., Haskard, D.O., Evans, P.C., 2007. Laminar shear stress acts as a switch to regulate divergent functions of NF-kappaB in endothelial cells. *FASEB Journal* 21, 3553–3561.
- Resnick, N., Yahav, H., Shay-Salit, A., Shushy, M., Schubert, S., Zilberman, L.C., Wofovitz, E., 2003. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 81, 177–199.
- Shirota, T., He, H., Yasui, H., Matsuda, T., 2003. Human endothelial progenitor cell-seeded hybrid graft: proliferative and antithrombogenic potentials in vitro and fabrication processing. *Tissue Engineering* 9, 127–136.
- Surapisitchat, J., Hoefen, R.J., Pi, X., Yoshizumi, M., Yan, C., Berk, B.C., 2001. Fluid shear stress inhibits TNF-alpha activation of JNK but not ERK1/2 or p38 in human umbilical vein endothelial cells: inhibitory crosstalk among MAPK family members. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 6476–6481.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

PUBLICATIONS

Role of Vascular Endothelial Growth Factor in the Communication between Human Osteoprogenitors and Endothelial Cells

Grellier M, Ferreira-Tojais N, Bourget C, Bareille R, Guillemot F, Amédée J
« Journal of Cellular Biochemistry », accepté.

Responsiveness of Human Bone Marrow Stromal Cells to Shear Stress

Grellier M, Bareille R, Bourget C, Amédée J
Soumis à « Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine ».

Co-immobilization of Human Osteoprogenitors and Endothelial Cells within Alginate Microspheres Enhances Mineralization in Bone Defect

Grellier M, Fricain J-C, Granja PL, Bidarra S, Renard M, Amédée J, Barbosa MA
Soumis à « Biomaterials ».

Unusual Transduction Response of Mature and Progenitor-Derived Endothelial Cells Exposed to Laminar Pulsatile Shear Stress.

Daculsi R, Grellier M, Rémy M, Bareille R, Pierron D, Bordenave L
Journal of Biomechanics. August 2008, 41:2781-5.

Signal transduction and procoagulant state of human cord blood progenitor derived endothelial cells after IL-1 α stimulation.

Daculsi R, Rémi-Zolghadri M, Grellier M, Conrad V, Fernandez P, Bareille R, Bordenave L
Endothelium. May 2007, 14(3): 163-71.

COMMUNICATIONS ORALES

Encapsulation of Osteoprogenitor and Endothelial cell Co-cultures for tissue Engineering.

Grellier M, Bidarra S, Bareille R, Fricain JC, Granja PL, Barbosa MA and Amédée J
ISACB 11th Biennial Meeting, Bordeaux, France, September 17-20, 2008.

Cooperation between human Osteoprogenitor and Endothelial Cells for Bone Tissue Engineering.

Grellier M, Bareille R, Bourget C, Ferreira Tojais N, Granja PL, Barbosa MA, Amédée J
Cell TERMIS -EU Chapter Meeting, London, England, September 4-7, 2007.

Cooperation Between Human Osteoprogenitor and Endothelial Cells: its Function on Bone Tissue Engineering.

Grellier M, Bareille R, Bourget C, Ferreira Tojais N, Granja PL, Barbosa MA, Amédée J
Cell ECM VIII Bone Tissue Engineering. Davos, Switzerland: June 25-28, 2007. European Cells and Materials Vol. 14. Suppl. 1, 2007 (page 33). **Prix pour la meilleure présentation orale.**

Cord Blood Derived Endothelial Progenitor Cells for Vascular Tissue Engineering: Enhanced Knowledge of Functional Properties.

Grellier M, Daculsi R, Rémi-Zolghadri M, Bareille R and Bordenave L
Annual Conference of the Tissue & Cell Engineering Society (TCES), London, England, June 2005.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

Cell Encapsulation for Vascularized Bone Tissue Engineering.

Grellier M, Bidarra SJ, Bareille R, Granja PL, Barbosa MA, Amédée J
8th World Biomaterials Congress, Amsterdam, The Netherlands, May 28th-June 1st, 2008.

Encapsulation of Osteoprogenitor and Endothelial cell Co-cultures for Bone Tissue Engineering application.

Grellier M, Bidarra SJ, Bareille R, Fricain JC, Amédée J, Granja PL, Barbosa MA
International Bone and Mineral Society (IBMS), Davos, Switzerland, March 9-14, 2008. Bone 2008;42:S22-S22

Cell Cooperation between Human OsteoProgenitor Cells and Endothelial Cells in Tissue Engineering.

Grellier M, Bareille R, Bourget C, Granja PL, Barbosa MA, Amédée J
American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) 29th Annual Meeting, Honolulu, Hawaii, USA, September 14-19, 2007. JBMR, 2007;22:S93-S93.

Cell Cooperation between human Osteoprogenitors and Endothelial Cells: its Function on Bone Tissue Engineering.

Grellier M, Bareille R, Bourget C, Amédée J
8th Advanced Summer Course in Cell-Materials Interactions, Porto, Portugal, June 18-22, 2007.

Human Osteroprogenitor Cells Regulate Human Endothelial Phenotype in Co-culture.

Grellier M, Bareille R, Bourget C, Guillotin B, Amédée J
American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) 28th Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, USA, September 15-19, 2006.

Surexpression of connexin 43 in human osteoprogenitor cells regulates osteogenic phenotype.

Bourget C, Bareille R, Grellier M, Amédée J
American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) 28th Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, USA, September 2006.

Human osteroprogenitor cells regulate human endothelial phenotype in co-culture.

Grellier M, Bareille R, Bourget C, Guillotin B, Amédée J
7th Advanced Summer Course in Cell-Materials Interactions, Porto, Portugal, June 19-23, 2006. **Prix pour le meilleur poster.**

BIBLIOGRAPHIE

- Abbah SA, Lu WW, Chan D, Cheung KM, Liu WG, Zhao F, Li ZY, Leong JC, Luk KD. 2006. In vitro evaluation of alginate encapsulated adipose-tissue stromal cells for use as injectable bone graft substitute. *Biochem Biophys Res Commun* 347:185-91.
- Abe J. 2006. Bone morphogenetic protein (BMP) family, SMAD signaling and Id helix-loop-helix proteins in the vasculature: the continuous mystery of BMPs pleiotropic effects. *J Mol Cell Cardiol* 41:4-7.
- Ahdjoudj S, Fromigue O, Marie PJ. 2004. Plasticity and regulation of human bone marrow stromal osteoprogenitor cells: potential implication in the treatment of age-related bone loss. *Histol Histopathol* 19:151-7.
- Alagiakrishnan K, Juby A, Hanley D, Tymchak W, Sclater A. 2003. Role of vascular factors in osteoporosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 58:362-6.
- Alford AI, Jacobs CR, Donahue HJ. 2003. Oscillating fluid flow regulates gap junction communication in osteocytic MLO-Y4 cells by an ERK1/2 MAP kinase-dependent mechanism small star, filled. *Bone* 33:64-70.
- Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Franceschi RT, Mooney DJ. 2001. Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering. *J Dent Res* 80:2025-9.
- Anselme K. 2000. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21:667-81.
- Ashammakhi N, Reis R, Chiellini E (2007): "Topics in Tissue Engineering."
- Athanasopoulos AN, Schneider D, Keiper T, Alt V, Pendurthi UR, Liegibel UM, Sommer U, Nawroth PP, Kasperk C, Chavakis T. 2007. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced up-regulation of CCN1 in osteoblasts mediates proangiogenic activities in endothelial cells and promotes fracture healing. *J Biol Chem* 282:26746-53.
- Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. 2006. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci* 6:623-33.
- Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, Jin DK, Dias S, Zhang F, Hartman TE, Hackett NR, Crystal RG, Witte L, Hicklin DJ, Bohlen P, Eaton D, Lyden D, de Sauvage F, Rafii S. 2004. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* 10:64-71.
- Bae JS, Gutierrez S, Narla R, Pratap J, Devados R, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB, Javed A. 2007. Reconstitution of Runx2/Cbfa1-null cells identifies a requirement for BMP2 signaling through a Runx2 functional domain during osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 100:434-49.
- Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. 2008. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* 2:169-83.
- Bakker AD, Soejima K, Klein-Nulend J, Burger EH. 2001. The production of nitric oxide and prostaglandin E(2) by primary bone cells is shear stress dependent. *J Biomech* 34:671-7.
- Bancroft GN, Sikavitsas VI, van den Dolder J, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA, Mikos AG. 2002. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12600-5.
- Barrias CC, Lamghari M, Granja PL, Sa Miranda MC, Barbosa MA. 2005. Biological evaluation of calcium alginate microspheres as a vehicle for the localized delivery of a therapeutic enzyme. *J Biomed Mater Res A* 74:545-52.
- Batra NN, Li YJ, Yellowley CE, You L, Malone AM, Kim CH, Jacobs CR. 2005. Effects of short-term recovery periods on fluid-induced signaling in osteoblastic cells. *J Biomech* 38:1909-17.

- Beresford JN. 1989. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop Relat Res*:270-80.
- Bigi A, Nicoli-Aldini N, Bracci B, Zavan B, Boanini E, Sbaiz F, Panzavolta S, Zorzato G, Giardino R, Facchini A, Abatangelo G, Cortivo R. 2007. In vitro culture of mesenchymal cells onto nanocrystalline hydroxyapatite-coated Ti13Nb13Zr alloy. *J Biomed Mater Res A* 82:213-21.
- Bilezikian JP, Raisz L, Rodan GA (1996): "Principles of Bone Biology." San Diego: Academic Press.
- Bjerre L, Bunger CE, Kassem M, Mygind T. 2008. Flow perfusion culture of human mesenchymal stem cells on silicate-substituted tricalcium phosphate scaffolds. *Biomaterials* 29:2616-27.
- Bolland BJ, Tilley S, New AM, Dunlop DG, Oreffo RO. 2007. Adult mesenchymal stem cells and impaction grafting: a new clinical paradigm shift. *Expert Rev Med Devices* 4:393-404.
- Bonewald LF. 2007. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci* 1116:281-90.
- Boontheekul T, Kong HJ, Mooney DJ. 2005. Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution. *Biomaterials* 26:2455-65.
- Bordenave L, Baquey C, Bareille R, Lefebvre F, Lauroua C, Guerin V, Rouais F, More N, Vergnes C, Anderson JM. 1993. Endothelial cell compatibility testing of three different Pellethanes. *J Biomed Mater Res* 27:1367-81.
- Bordenave L, Lefebvre F, Bareille R, Rouais F, Baquey C, Rabaud M. 1992. New artificial connective matrix-like structure: thrombogenicity and use as endothelial cell culture support. *Biomaterials* 13:439-47.
- Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA, Longaker MT. 2002a. Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg* 109:2384-97.
- Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Steinbrech DS, Mehrara BJ, Longaker MT. 2002b. Factors in the fracture microenvironment induce primary osteoblast angiogenic cytokine production. *Plast Reconstr Surg* 110:139-48.
- Bunnell BA, Estes BT, Guilak F, Gimple JM. 2008. Differentiation of adipose stem cells. *Methods Mol Biol* 456:155-71.
- Burger EH, Klein-Nulend J. 1999. Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *Faseb J* 13 Suppl:S101-12.
- Burkhardt R, Kettner G, Bohm W, Schmidmeier M, Schlag R, Frisch B, Mallmann B, Eisenmenger W, Gilg T. 1987. Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis, and old age: a comparative histomorphometric study. *Bone* 8:157-64.
- Carano RA, Filvaroff EH. 2003. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 8:980-9.
- Carmeliet P, Collen D. 2000. Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin. *Ann N Y Acad Sci* 902:249-62; discussion 262-4.
- Casteilla L, Dani C. 2006. Adipose tissue-derived cells: from physiology to regenerative medicine. *Diabetes Metab* 32:393-401.
- Charras GT, Horton MA. 2002. Single cell mechanotransduction and its modulation analyzed by atomic force microscope indentation. *Biophys J* 82:2970-81.
- Chen NX, Ryder KD, Pavalko FM, Turner CH, Burr DB, Qiu J, Duncan RL. 2000. Ca(2+) regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C989-97.

- Cheng C, Liu H, Ge H, Qian J, Qin J, Sun L, Shen A. 2007. Essential role of Src suppressed C kinase substrates in endothelial cell adhesion and spreading. *Biochem Biophys Res Commun* 358:342-8.
- Cheng SL, Lecanda F, Davidson MK, Warlow PM, Zhang SF, Zhang L, Suzuki S, St John T, Civitelli R. 1998. Human osteoblasts express a repertoire of cadherins, which are critical for BMP-2-induced osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res* 13:633-44.
- Cherian PP, Cheng B, Gu S, Sprague E, Bonewald LF, Jiang JX. 2003. Effects of mechanical strain on the function of Gap junctions in osteocytes are mediated through the prostaglandin EP2 receptor. *J Biol Chem* 278:43146-56.
- Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Gu S, Wang X, Bonewald LF, Sprague E, Jiang JX. 2005. Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell* 16:3100-6.
- Childs SG. 2005. Osteonecrosis: death of bone cells. *Orthop Nurs* 24:295-301; quiz 302-3.
- Choi IH, Chung CY, Cho TJ, Yoo WJ. 2002. Angiogenesis and mineralization during distraction osteogenesis. *J Korean Med Sci* 17:435-47.
- Chollet C, Chanseau C, Brouillaud B, Durrieu MC. 2007. RGD peptides grafting onto poly(ethylene terephthalate) with well controlled densities. *Biomol Eng* 24:477-82.
- Chua CC, Chua BH, Chen Z, Landy C, Hamdy RC. 2002. TGF-beta1 inhibits multiple caspases induced by TNF-alpha in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochim Biophys Acta* 1593:1-8.
- Civitelli R. 2008. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys* 473:188-92.
- Clarkin CE, Emery RJ, Pitsillides AA, Wheeler-Jones CP. 2007. Evaluation of VEGF-mediated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells. *J Cell Physiol*.
- Clines GA, Mohammad KS, Bao Y, Stephens OW, Suva LJ, Shaughnessy JD, Jr., Fox JW, Chirgwin JM, Guise TA. 2007. Dickkopf homolog 1 mediates endothelin-1-stimulated new bone formation. *Mol Endocrinol* 21:486-98.
- Collin-Osdoby P. 1994. Role of vascular endothelial cells in bone biology. *J Cell Biochem* 55:304-9.
- Collin-Osdoby P, Rothe L, Bekker S, Anderson F, Osdoby P. 2000. Decreased nitric oxide levels stimulate osteoclastogenesis and bone resorption both in vitro and in vivo on the chick chorioallantoic membrane in association with neoangiogenesis. *J Bone Miner Res* 15:474-88.
- Cross MJ, Claesson-Welsh L. 2001. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 22:201-7.
- Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. 2003. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci* 28:488-94.
- Daci E, Everts V, Torrekens S, Van Herck E, Tigchelaar-Gutter W, Bouillon R, Carmeliet G. 2003. Increased bone formation in mice lacking plasminogen activators. *J Bone Miner Res* 18:1167-76.
- Daculsi R, Grellier M, Remy M, Bareille R, Pierron D, Fernandez P, Bordenave L. 2008. Unusual transduction response of progenitor-derived and mature endothelial cells exposed to laminar pulsatile shear stress. *J Biomech* 41:2781-5.
- Daculsi R, Remy-Zolghadri M, Grellier M, Conrad V, Fernandez P, Bareille R, Bordenave L. 2007. Signal transduction and procoagulant state of human cord blood--progenitor-derived endothelial cells after interleukin-1alpha stimulation. *Endothelium* 14:163-71.

- Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, Bonewald LF. 2002. Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta)-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix. *J Biol Chem* 277:21352-60.
- Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Lowik CW. 2000. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* 141:1667-74.
- Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE, Lowik CW. 2002. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 143:1545-53.
- Del Fattore A, Teti A, Rucci N. 2008. Osteoclast receptors and signaling. *Arch Biochem Biophys* 473:147-60.
- Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. 2003. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 47:149-61.
- Drury JL, Dennis RG, Mooney DJ. 2004. The tensile properties of alginate hydrogels. *Biomaterials* 25:3187-99.
- Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. 1996. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382:448-52.
- Dufour C, Holy X, Marie PJ. 2008. Transforming growth factor-beta prevents osteoblast apoptosis induced by skeletal unloading via PI3K/Akt, Bcl-2, and phospho-Bad signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E794-801.
- Durrieu MC, Pallu S, Guillemot F, Bareille R, Amedee J, Baquey CH, Labrugere C, Dard M. 2004. Grafting RGD containing peptides onto hydroxyapatite to promote osteoblastic cells adhesion. *J Mater Sci Mater Med* 15:779-86.
- Edgar AJ, Dover SL, Lodrick MN, McKay IJ, Hughes FJ, Turner W. 2005. Bone morphogenetic protein-2 induces expression of murine zinc finger transcription factor ZNF450. *J Cell Biochem* 94:202-15.
- Enneking WF, Campanacci DA. 2001. Retrieved human allografts : a clinicopathological study. *J Bone Joint Surg Am* 83-A:971-86.
- Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nomura S, Himeno M, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T. 2000. Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem* 275:8695-702.
- Evangelista MB, Hsiong SX, Fernandes R, Sampaio P, Kong HJ, Barrias CC, Salema R, Barbosa MA, Mooney DJ, Granja PL. 2007. Upregulation of bone cell differentiation through immobilization within a synthetic extracellular matrix. *Biomaterials* 28:3644-55.
- Evans WH, Martin PE. 2002. Lighting up gap junction channels in a flash. *Bioessays* 24:876-80.
- Fan X, Rahnert JA, Murphy TC, Nanes MS, Greenfield EM, Rubin J. 2006. Response to mechanical strain in an immortalized pre-osteoblast cell is dependent on ERK1/2. *J Cell Physiol* 207:454-60.
- Faucheux C, Bareille R, Amedee J. 1998. Synthesis of calbindin-D28K during mineralization in human bone marrow stromal cells. *Biochem J* 333 (Pt 3):817-23.
- Faure C, Linossier MT, Malaval L, Lafage-Proust MH, Peyroche S, Vico L, Guignandon A. 2008. Mechanical signals modulated vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) alternative splicing in osteoblastic cells through actin polymerisation. *Bone* 42:1092-101.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9:669-76.

- Fiedler J, Leucht F, Waltenberger J, Dehio C, Brenner RE. 2005. VEGF-A and PlGF-1 stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 334:561-8.
- Fischer LP, Carret JP, Gonon GP, de Mourgues G, Clermont A. 1977. Technique d'étude de la vascularisation artérielle de l'os. *International Orthopaedics* 1:171-178.
- Fittkau MH, Zilla P, Bezuidenhout D, Lutolf MP, Human P, Hubbell JA, Davies N. 2005. The selective modulation of endothelial cell mobility on RGD peptide containing surfaces by YIGSR peptides. *Biomaterials* 26:167-74.
- Frangos JA, McIntire LV, Eskin SG. 1988. Shear stress induced stimulation of mammalian cell metabolism. *Biotechnol Bioeng* 32:1053-60.
- Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, Zych GA, Calhoun JH, LaForte AJ, Yin S. 2001. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1:S151-8.
- Frost HM. 1983. A determinant of bone architecture. The minimum effective strain. *Clin Orthop Relat Res*:286-92.
- Garnero P, Bianchi F, Carlier MC, Genty V, Jacob N, Kamel S, Kindermans C, Plouvier E, Pressac M, Souberbielle JC. 2000. [Biochemical markers of bone remodeling: pre-analytical variations and guidelines for their use. SFBC (Société Française de Biologie Clinique) Work Group. Biochemical markers of bone remodeling]. *Ann Biol Clin (Paris)* 58:683-704.
- Garnero P, Borel O, Gineyts E, Duboeuf F, Solberg H, Bouxsein ML, Christiansen C, Delmas PD. 2006. Extracellular post-translational modifications of collagen are major determinants of biomechanical properties of fetal bovine cortical bone. *Bone* 38:300-9.
- Geesink RG, Hoefnagels NH, Bulstra SK. 1999. Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. *J Bone Joint Surg Br* 81:710-8.
- Gennero I, Moulin P, Edouard T, Conte-Auriol F, Tauber MT, Salles JP. 2004. [Bone mineral metabolism: recent data and perspectives related to osteogenesis]. *Arch Pediatr* 11:1473-83.
- Gerber HP, Ferrara N. 2000. Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med* 10:223-8.
- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. 1998. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 273:30336-43.
- Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. 1999. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5:623-8.
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C. 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 161:1163-77.
- Glass DA, 2nd, Karsenty G. 2007. In vivo analysis of Wnt signaling in bone. *Endocrinology* 148:2630-4.
- Glowacki J. 1998. Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*:S82-9.
- Gordeladze JO, Noel D, Bony C, Apparailly F, Louis-Pence P, Jorgensen C. 2008. Transient down-regulation of cbfa1/Runx2 by RNA interference in murine C3H10T1/2 mesenchymal stromal cells delays in vitro and in vivo osteogenesis, but does not overtly affect chondrogenesis. *Exp Cell Res* 314:1495-506.

- Gordon JA, Tye CE, Sampaio AV, Underhill TM, Hunter GK, Goldberg HA. 2007. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone* 41:462-73.
- Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G. 2003. Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- β receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med* 13:301-7.
- Gramsch B, Gabriel HD, Wiemann M, Grummer R, Winterhager E, Bingmann D, Schirmacher K. 2001. Enhancement of connexin 43 expression increases proliferation and differentiation of an osteoblast-like cell line. *Exp Cell Res* 264:397-407.
- Granja PL, De Jeso B, Bareille R, Rouais F, Baquey C, Barbosa MA. 2005. Mineralization of regenerated cellulose hydrogels induced by human bone marrow stromal cells. *Eur Cell Mater* 10:31-7; discussion 37-9.
- Grano M, Galimi F, Zambonin G, Colucci S, Cottone E, Zallone AZ, Comoglio PM. 1996. Hepatocyte growth factor is a coupling factor for osteoclasts and osteoblasts in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7644-8.
- Grunert M, Dombrowski C, Sadasivam M, Manton K, Cool SM, Nurcombe V. 2007. Isolation of a native osteoblast matrix with a specific affinity for BMP2. *J Mol Histol* 38:393-404.
- Guarino V, Causa F, Ambrosio L. 2007. Bioactive scaffolds for bone and ligament tissue. *Expert Rev Med Devices* 4:405-18.
- Guillemot F. 2005. Recent advances in the design of titanium alloys for orthopedic applications. *Expert Rev Med Devices* 2:741-8.
- Guillotin B, Bareille R, Bourget C, Bordenave L, Amedee J. 2008. Interaction between human umbilical vein endothelial cells and human osteoprogenitors triggers pleiotropic effect that may support osteoblastic function. *Bone*.
- Guillotin B, Bourget C, Remy-Zolgadri M, Bareille R, Fernandez P, Conrad V, Amedee-Vilamitjana J. 2004. Human primary endothelial cells stimulate human osteoprogenitor cell differentiation. *Cell Physiol Biochem* 14:325-32.
- Guillou-Buffello DL, Bareille R, Gindre M, Sewing A, Laugier P, Amedee J. 2008. Additive Effect of RGD Coating to Functionalized Titanium Surfaces on Human Osteoprogenitor Cell Adhesion and Spreading. *Tissue Eng Part A*.
- Hadjiargyrou M, Ahrens W, Rubin CT. 2000. Temporal expression of the chondrogenic and angiogenic growth factor CYR61 during fracture repair. *J Bone Miner Res* 15:1014-23.
- Harris AL. 2002. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2:38-47.
- Hay E, Lemonnier J, Modrowski D, Lomri A, Lasmoles F, Marie PJ. 2000. N- and E-cadherin mediate early human calvaria osteoblast differentiation promoted by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Physiol* 183:117-28.
- Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. 2002. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109:625-37.
- Hersel U, Dahmen C, Kessler H. 2003. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 24:4385-415.
- Hibi H, Yamada Y, Kagami H, Ueda M. 2006a. Distraction osteogenesis assisted by tissue engineering in an irradiated mandible: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 21:141-7.
- Hibi H, Yamada Y, Ueda M, Endo Y. 2006b. Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material. *Int J Oral Maxillofac Surg* 35:551-5.

- Hillsley MV, Frangos JA. 1997. Alkaline phosphatase in osteoblasts is down-regulated by pulsatile fluid flow. *Calcif Tissue Int* 60:48-53.
- Hossain M, Irwin R, Baumann MJ, McCabe LR. 2005. Hepatocyte growth factor (HGF) adsorption kinetics and enhancement of osteoblast differentiation on hydroxyapatite surfaces. *Biomaterials* 26:2595-602.
- Hunter WL, Arsenault AL, Hodsmann AB. 1991. Rearrangement of the metaphyseal vasculature of the rat growth plate in rickets and rachitic reversal: a model of vascular arrest and angiogenesis renewed. *Anat Rec* 229:453-61.
- Ishida A, Fujita N, Kitazawa R, Tsuruo T. 2002. Transforming growth factor-beta induces expression of receptor activator of NF-kappa B ligand in vascular endothelial cells derived from bone. *J Biol Chem* 277:26217-24.
- Jackson RA, Kumarasuriyar A, Nurcombe V, Cool SM. 2006. Long-term loading inhibits ERK1/2 phosphorylation and increases FGFR3 expression in MC3T3-E1 osteoblast cells. *J Cell Physiol* 209:894-904.
- Jaffe EA. 1980. Culture of human endothelial cells. *Transplant Proc* 12:49-53.
- Jain RK. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9:685-93.
- Javed A, Bae JS, Afzal F, Gutierrez S, Pratap J, Zaidi SK, Lou Y, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. 2008. Structural coupling of Smad and Runx2 for execution of the BMP2 osteogenic signal. *J Biol Chem* 283:8412-22.
- Jessop HL, Rawlinson SC, Pitsillides AA, Lanyon LE. 2002. Mechanical strain and fluid movement both activate extracellular regulated kinase (ERK) in osteoblast-like cells but via different signaling pathways. *Bone* 31:186-94.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-9.
- Jun HW, West JL. 2005. Modification of polyurethaneurea with PEG and YIGSR peptide to enhance endothelialization without platelet adhesion. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 72:131-9.
- Kaigler D, Krebsbach PH, Wang Z, West ER, Horger K, Mooney DJ. 2006a. Transplanted endothelial cells enhance orthotopic bone regeneration. *J Dent Res* 85:633-7.
- Kaigler D, Krebsbach PH, West ER, Horger K, Huang YC, Mooney DJ. 2005. Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. *Faseb J* 19:665-7.
- Kaigler D, Wang Z, Horger K, Mooney DJ, Krebsbach PH. 2006b. VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects. *J Bone Miner Res* 21:735-44.
- Kanaan RA, Kanaan LA. 2006. Transforming growth factor beta1, bone connection. *Med Sci Monit* 12:RA164-9.
- Kanczler JM, Ginty PJ, Barry JJ, Clarke NM, Howdle SM, Shakesheff KM, Oreffo RO. 2008. The effect of mesenchymal populations and vascular endothelial growth factor delivered from biodegradable polymer scaffolds on bone formation. *Biomaterials* 29:1892-900.
- Kanczler JM, Oreffo RO. 2008. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater* 15:100-14.
- Kapur S, Baylink DJ, Lau KH. 2003. Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways. *Bone* 32:241-51.
- Karadag A, Fisher LW. 2006. Bone sialoprotein enhances migration of bone marrow stromal cells through matrices by bridging MMP-2 to alpha(v)beta3-integrin. *J Bone Miner Res* 21:1627-36.

- Keshaw H, Forbes A, Day RM. 2005. Release of angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass. *Biomaterials* 26:4171-9.
- Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Mitsuyama H, Nakamura H, Katoh M, Ishiguro N. 2004. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis--a preliminary result of three cases. *Bone* 35:892-8.
- Klein-Nulend J, Bacabac RG, Mullender MG. 2005. Mechanobiology of bone tissue. *Pathol Biol (Paris)* 53:576-80.
- Klein-Nulend J, Bacabac RG, Veldhuijzen JP, Van Loon JJ. 2003. Microgravity and bone cell mechanosensitivity. *Adv Space Res* 32:1551-9.
- Klein-Nulend J, Helfrich MH, Sterck JG, MacPherson H, Joldersma M, Ralston SH, Semeins CM, Burger EH. 1998. Nitric oxide response to shear stress by human bone cell cultures is endothelial nitric oxide synthase dependent. *Biochem Biophys Res Commun* 250:108-14.
- Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. 2006. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med* 10:7-19.
- Kobayashi H, Gao Y, Ueta C, Yamaguchi A, Komori T. 2000. Multilineage differentiation of Cbfa1-deficient calvarial cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 273:630-6.
- Kong HJ, Smith MK, Mooney DJ. 2003. Designing alginate hydrogels to maintain viability of immobilized cells. *Biomaterials* 24:4023-9.
- Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. 2005. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda)* 20:349-56.
- Kreke MR, Sharp LA, Lee YW, Goldstein AS. 2008. Effect of intermittent shear stress on mechanotransductive signaling and osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A* 14:529-37.
- Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. 2006. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 116:1202-9.
- Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, Kamoi K, Suda T. 1998. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology* 139:1338-45.
- Lagumdzija A, Ou G, Petersson M, Bucht E, Gonon A, Pernow Y. 2004. Inhibited anabolic effect of insulin-like growth factor-I on stromal bone marrow cells in endothelial nitric oxide synthase-knockout mice. *Acta Physiol Scand* 182:29-35.
- Lake AC, Vassy R, Di Benedetto M, Lavigne D, Le Visage C, Perret GY, Letourneur D. 2006. Low molecular weight fucoidan increases VEGF165-induced endothelial cell migration by enhancing VEGF165 binding to VEGFR-2 and NRP1. *J Biol Chem* 281:37844-52.
- Lamallice L, Le Boeuf F, Huot J. 2007. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res* 100:782-94.
- Lammi MJ, Hayrinen J, Mahonen A. 2006. Proteomic analysis of cartilage- and bone-associated samples. *Electrophoresis* 27:2687-701.
- Lampe PD, Lau AF. 2000. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* 384:205-15.
- Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C, Dejana E. 2006. Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol* 174:593-604.
- Lapidot T, Dar A, Kollet O. 2005. How do stem cells find their way home? *Blood* 106:1901-10.
- Laroche M. 2002. Intraosseous circulation from physiology to disease. *Joint Bone Spine* 69:262-9.

- Lazzarini L, Mader JT, Calhoun JH. 2004. Osteomyelitis in long bones. *J Bone Joint Surg Am* 86-A:2305-18.
- Leal D, Matsuhiro B, Rossi M, Caruso F. 2008. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydr Res* 343:308-16.
- Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, Ten Dijke P. 2005. TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* 65:599-608.
- Lecanda F, Towler DA, Ziambaras K, Cheng SL, Koval M, Steinberg TH, Civitelli R. 1998. Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. *Mol Biol Cell* 9:2249-58.
- Lecanda F, Warlow PM, Sheikh S, Furlan F, Steinberg TH, Civitelli R. 2000. Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *J Cell Biol* 151:931-44.
- Leu SJ, Lam SC, Lau LF. 2002. Pro-angiogenic activities of CYR61 (CCN1) mediated through integrins α 5 β 3 and α 6 β 1 in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 277:46248-55.
- Li YJ, Batra NN, You L, Meier SC, Coe IA, Yellowley CE, Jacobs CR. 2004. Oscillatory fluid flow affects human marrow stromal cell proliferation and differentiation. *J Orthop Res* 22:1283-9.
- Lu HH, Vo JM, Chin HS, Lin J, Cozin M, Tsay R, Eisig S, Landesberg R. 2008. Controlled delivery of platelet-rich plasma-derived growth factors for bone formation. *J Biomed Mater Res A*.
- Lubiatowski P, Kruczynski J, Gradys A, Trzeciak T, Jaroszewski J. 2006. Articular cartilage repair by means of biodegradable scaffolds. *Transplant Proc* 38:320-2.
- Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R. 2007. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng* 13:947-55.
- Marie PJ. 2002. Role of N-cadherin in bone formation. *J Cell Physiol* 190:297-305.
- Marie PJ. 2003. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene* 316:23-32.
- Marie PJ. 2008. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys* 473:98-105.
- Marolt D, Augst A, Freed LE, Vepari C, Fajardo R, Patel N, Gray M, Farley M, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G. 2006. Bone and cartilage tissue constructs grown using human bone marrow stromal cells, silk scaffolds and rotating bioreactors. *Biomaterials* 27:6138-49.
- Martin I, Wendt D, Heberer M. 2004. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 22:80-6.
- Marui A, Kanematsu A, Yamahara K, Doi K, Kushibiki T, Yamamoto M, Itoh H, Ikeda T, Tabata Y, Komeda M. 2005. Simultaneous application of basic fibroblast growth factor and hepatocyte growth factor to enhance the blood vessels formation. *J Vasc Surg* 41:82-90.
- Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aburatani H, Nishimura R, Yoneda T. 2008. BMP2 Regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during Osteoblast Differentiation. *J Biol Chem* 283:29119-25.
- Matsuzaki E, Takahashi-Yanaga F, Miwa Y, Hirata M, Watanabe Y, Sato N, Morimoto S, Hirofuji T, Maeda K, Sasaguri T. 2006. Differentiation-inducing factor-1 alters canonical Wnt signaling and suppresses alkaline phosphatase expression in osteoblast-like cell lines. *J Bone Miner Res* 21:1307-16.
- Mayer H, Bertram H, Lindenmaier W, Korff T, Weber H, Weich H. 2005. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells:

- autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. *J Cell Biochem* 95:827-39.
- Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Gunther KP, Dehio C, Puhl W, Brenner RE. 2002. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone* 30:472-7.
- Mbalaviele G, Shin CS, Civitelli R. 2006. Cell-cell adhesion and signaling through cadherins: connecting bone cells in their microenvironment. *J Bone Miner Res* 21:1821-7.
- McGarry JG, Klein-Nulend J, Prendergast PJ. 2005. The effect of cytoskeletal disruption on pulsatile fluid flow-induced nitric oxide and prostaglandin E2 release in osteocytes and osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 330:341-8.
- Mehrotra M, Saegusa M, Voznesensky O, Pilbeam C. 2006. Role of Cbfa1/Runx2 in the fluid shear stress induction of COX-2 in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 341:1225-30.
- Meury T, Verrier S, Alini M. 2006. Human endothelial cells inhibit BMSC differentiation into mature osteoblasts in vitro by interfering with osterix expression. *J Cell Biochem* 98:992-1006.
- Miralem T, Steinberg R, Price D, Avraham H. 2001. VEGF(165) requires extracellular matrix components to induce mitogenic effects and migratory response in breast cancer cells. *Oncogene* 20:5511-24.
- Morishita T, Honoki K, Ohgushi H, Kotobuki N, Matsushima A, Takakura Y. 2006. Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three cases of cultured bone grafts derived from patients' mesenchymal stem cells. *Artif Organs* 30:115-8.
- Murphy WL, Simmons CA, Kaigler D, Mooney DJ. 2004. Bone regeneration via a mineral substrate and induced angiogenesis. *J Dent Res* 83:204-10.
- Myers KA, Rattner JB, Shrive NG, Hart DA. 2007. Osteoblast-like cells and fluid flow: cytoskeleton-dependent shear sensitivity. *Biochem Biophys Res Commun* 364:214-9.
- Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, Kikuchi Y, Saito Y, Tamai K, Ogihara T, Kaneda Y. 2005. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2542-7.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108:17-29.
- Nanci A. 1999. Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. *J Struct Biol* 126:256-69.
- Navarro P, Ruco L, Dejana E. 1998. Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization. *J Cell Biol* 140:1475-84.
- Negroiu G, Piticescu RM, Chitanu GC, Mihailescu IN, Zdrentu L, Miroiu M. 2008. Biocompatibility evaluation of a novel hydroxyapatite-polymer coating for medical implants (in vitro tests). *J Mater Sci Mater Med* 19:1537-44.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 13:9-22.
- Niger C, Geneau G, Fiorini C, Defamie N, Pointis G, Mesnil M, Cronier L. 2008. Endothelin-1 inhibits human osteoblastic cell differentiation: influence of connexin-43 expression level. *J Cell Biochem* 103:110-22.
- Okazaki M, Takeshita S, Kawai S, Kikuno R, Tsujimura A, Kudo A, Amann E. 1994. Molecular cloning and characterization of OB-cadherin, a new member of cadherin family expressed in osteoblasts. *J Biol Chem* 269:12092-8.

- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. 2006. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:359-71.
- Oreffo RO, Triffitt JT. 1999. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. *Bone* 25:5S-9S.
- Ortega N, Behonick D, Stickens D, Werb Z. 2003. How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 995:109-16.
- Otsuru S, Tamai K, Yamazaki T, Yoshikawa H, Kaneda Y. 2008. Circulating bone marrow-derived osteoblast progenitor cells are recruited to the bone-forming site by the CXCR4/stromal cell-derived factor-1 pathway. *Stem Cells* 26:223-34.
- Pallu S, Bourget C, Bareille R, Labrugere C, Dard M, Sewing A, Jonczyk A, Vernizeau M, Christine Durrieu M, Amedee-Vilamitjana J. 2005. The effect of cyclo-DfKRG peptide immobilization on titanium on the adhesion and differentiation of human osteoprogenitor cells. *Biomaterials* 26:6932-40.
- Passuti N, Delecun J, Gouin F, Heymann D. 1999. Substituts osseux. *Encycl Méd Chir Appareil locomoteur*:6p.
- Pierschbacher MD, Ruoslahti E. 1984. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309:30-3.
- Plachokova AS, Nikolidakis D, Mulder J, Jansen JA, Creugers NH. 2008. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 19:539-45.
- Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L, Casteilla L. 2004. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109:656-63.
- Plouffe BD, Njoka DN, Harris J, Liao J, Horick NK, Radisic M, Murthy SK. 2007. Peptide-mediated selective adhesion of smooth muscle and endothelial cells in microfluidic shear flow. *Langmuir* 23:5050-5.
- Ponik S, Pavalko F. 2002. [SU167] Mechanical Properties of the Extracellular Matrix Regulate Fluid Shear-Induced Metabolism of Prostaglandins in Osteoblasts. *ASBMR*.
- Porte-Durrieu MC, Guillemot F, Pallu S, Labrugere C, Brouillaud B, Bareille R, Amedee J, Barthe N, Dard M, Baquay C. 2004. Cyclo-(DfKRG) peptide grafting onto Ti-6Al-4V: physical characterization and interest towards human osteoprogenitor cells adhesion. *Biomaterials* 25:4837-46.
- Potter E, Bergwitz C, Brabant G. 1999. The cadherin-catenin system: implications for growth and differentiation of endocrine tissues. *Endocr Rev* 20:207-39.
- Prince M, Banerjee C, Javed A, Green J, Lian JB, Stein GS, Bodine PV, Komm BS. 2001. Expression and regulation of Runx2/Cbfa1 and osteoblast phenotypic markers during the growth and differentiation of human osteoblasts. *J Cell Biochem* 80:424-40.
- Purroy J, Spurr NK. 2002. Molecular genetics of calcium sensing in bone cells. *Hum Mol Genet* 11:2377-84.
- Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. 2001. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 344:385-6.
- Quinn JM, Itoh K, Udagawa N, Hausler K, Yasuda H, Shima N, Mizuno A, Higashio K, Takahashi N, Suda T, Martin TJ, Gillespie MT. 2001. Transforming growth factor beta affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. *J Bone Miner Res* 16:1787-94.
- Rezania A, Healy KE. 1999. Biomimetic peptide surfaces that regulate adhesion, spreading, cytoskeletal organization, and mineralization of the matrix deposited by osteoblast-like cells. *Biotechnol Prog* 15:19-32.

- Ribeiro CC, Barrias CC, Barbosa MA. 2006. Preparation and characterisation of calcium-phosphate porous microspheres with a uniform size for biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med* 17:455-63.
- Riddle RC, Taylor AF, Genetos DC, Donahue HJ. 2006. MAP kinase and calcium signaling mediate fluid flow-induced human mesenchymal stem cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C776-84.
- Robling AG, Castillo AB, Turner CH. 2006. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng* 8:455-98.
- Rodda SJ, McMahon AP. 2006. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development* 133:3231-44.
- Rousseau S, Houle F, Huot J. 2000. Integrating the VEGF signals leading to actin-based motility in vascular endothelial cells. *Trends Cardiovasc Med* 10:321-7.
- Rouwkema J (2007): *Prevascularized Bone Tissue Engineering* Enschede: University of Twente.
- Rouwkema J, de Boer J, Van Blitterswijk CA. 2006. Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue Eng* 12:2685-93.
- Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. 1999. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 20:45-53.
- Rowley JA, Mooney DJ. 2002. Alginate type and RGD density control myoblast phenotype. *J Biomed Mater Res* 60:217-23.
- Rubin J, Rubin C, Jacobs CR. 2006. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene* 367:1-16.
- Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. 1998. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest* 101:731-6.
- Ryoo HM, Lee MH, Kim YJ. 2006. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene* 366:51-7.
- Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Dudziak ME, Greenwald JA, Luchs JS, Spector JA, Ueno H, Gittes GK, Longaker MT. 1999. Transforming growth factor-beta1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. *Am J Physiol* 277:C628-37.
- Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. 2003. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 83:1359-400.
- San Juan A, Hlawaty H, Chaubet F, Letourneur D, Feldman LJ. 2007. Cationized pullulan 3D matrices as new materials for gene transfer. *J Biomed Mater Res A* 82:354-62.
- Saniger ML, Oya R, Macias D, Dominguez JN, Aranega A, Luque F. 2006. c-Jun kinase mediates expression of VEGF induced at transcriptional level by Rac1 and Cdc42Hs but not by RhoA. *J Cell Biochem* 98:650-60.
- Scherberich A, Galli R, Jaquiere C, Farhadi J, Martin I. 2007. Three-dimensional perfusion culture of human adipose tissue-derived endothelial and osteoblastic progenitors generates osteogenic constructs with intrinsic vascularization capacity. *Stem Cells* 25:1823-9.
- Schiller PC, D'Ippolito G, Balkan W, Roos BA, Howard GA. 2001. Gap-junctional communication mediates parathyroid hormone stimulation of mineralization in osteoblastic cultures. *Bone* 28:38-44.

- Schmidmaier G, Schwabe P, Wildemann B, Haas NP. 2007. Use of bone morphogenetic proteins for treatment of non-unions and future perspectives. *Injury* 38 Suppl 4:S35-41.
- Schnettler R, Alt V, Dingeldein E, Pfefferle HJ, Kilian O, Meyer C, Heiss C, Wenisch S. 2003. Bone ingrowth in bFGF-coated hydroxyapatite ceramic implants. *Biomaterials* 24:4603-8.
- Sengenès C, Miranville A, Maumus M, de Barros S, Busse R, Bouloumie A. 2007. Chemotaxis and differentiation of human adipose tissue CD34+/CD31- progenitor cells: role of stromal derived factor-1 released by adipose tissue capillary endothelial cells. *Stem Cells* 25:2269-76.
- Shiozawa Y, Havens AM, Pienta KJ, Taichman RS. 2008. The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites. *Leukemia* 22:941-50.
- Shirakabe K, Terasawa K, Miyama K, Shibuya H, Nishida E. 2001. Regulation of the activity of the transcription factor Runx2 by two homeobox proteins, Msx2 and Dlx5. *Genes Cells* 6:851-6.
- Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ. 2003. Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res* 34:565-71.
- Siebers MC, ter Brugge PJ, Walboomers XF, Jansen JA. 2005. Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials* 26:137-46.
- Siegbahn A, Johnell M, Sorensen BB, Petersen LC, Heldin CH. 2005. Regulation of chemotaxis by the cytoplasmic domain of tissue factor. *Thromb Haemost* 93:27-34.
- Silverman MD, Waters CR, Hayman GT, Wigboldus J, Samet MM, Lelkes PI. 1999. Tissue factor activity is increased in human endothelial cells cultured under elevated static pressure. *Am J Physiol* 277:C233-42.
- Simmons CA, Alsberg E, Hsiong S, Kim WJ, Mooney DJ. 2004. Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone* 35:562-9.
- Simmons CA, Matlis S, Thornton AJ, Chen S, Wang CY, Mooney DJ. 2003. Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signaling pathway. *J Biomech* 36:1087-96.
- Solan JL, Lampe PD. 2007. Key connexin 43 phosphorylation events regulate the gap junction life cycle. *J Membr Biol* 217:35-41.
- Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. 2008. Human dermal fibroblast subpopulations; differential interactions with vascular endothelial cells in coculture: nonsoluble factors in the extracellular matrix influence interactions. *Wound Repair Regen* 16:300-9.
- Springer IN, Niehoff P, Acil Y, Marget M, Lange A, Warnke PH, Pielenz H, Roldan JC, Wiltfang J. 2008. BMP-2 and bFGF in an irradiated bone model. *J Craniomaxillofac Surg* 36:210-7.
- Stahl A, Wenger A, Weber H, Stark GB, Augustin HG, Finkenzeller G. 2004. Bi-directional cell contact-dependent regulation of gene expression between endothelial cells and osteoblasts in a three-dimensional spheroidal coculture model. *Biochem Biophys Res Commun* 322:684-92.
- Stains JP, Civitelli R. 2005. Cell-cell interactions in regulating osteogenesis and osteoblast function. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75:72-80.
- Standal T, Abildgaard N, Fagerli UM, Stordal B, Hjertner O, Borset M, Sundan A. 2007. HGF inhibits BMP-induced osteoblastogenesis: possible implications for the bone disease of multiple myeloma. *Blood* 109:3024-30.

- Stevens MM, Marini RP, Schaefer D, Aronson J, Langer R, Shastri VP. 2005. In vivo engineering of organs: the bone bioreactor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11450-5.
- Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH. 2002. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9656-61.
- Suarez S, Ballmer-Hofer K. 2001. VEGF transiently disrupts gap junctional communication in endothelial cells. *J Cell Sci* 114:1229-35.
- Sun H, Qu Z, Guo Y, Zang G, Yang B. 2007. In vitro and in vivo effects of rat kidney vascular endothelial cells on osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells growing on polylactide-glycolic acid (PLGA) scaffolds. *Biomed Eng Online* 6:41.
- Sun L, Vitolo M, Passaniti A. 2001. Runt-related gene 2 in endothelial cells: inducible expression and specific regulation of cell migration and invasion. *Cancer Res* 61:4994-5001.
- Sutherland RM, Sordat B, Bamat J, Gabbert H, Bourrat B, Mueller-Klieser W. 1986. Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma. *Cancer Res* 46:5320-9.
- Takazawa Y, Tsuji K, Nifuji A, Kurosawa H, Ito Y, Noda M. 2000. An osteogenesis-related transcription factor, core-binding factor A1, is constitutively expressed in the chondrocytic cell line TC6, and its expression is upregulated by bone morphogenetic protein-2. *J Endocrinol* 165:579-86.
- Tanaka SM, Sun HB, Roeder RK, Burr DB, Turner CH, Yokota H. 2005. Osteoblast responses one hour after load-induced fluid flow in a three-dimensional porous matrix. *Calcif Tissue Int* 76:261-71.
- Tarquini R, Perfetto F, Tarquini B. 1998. Endothelin-1 and Paget's bone disease: is there a link? *Calcif Tissue Int* 63:118-20.
- Taylor AF, Saunders MM, Shingle DL, Cimbala JM, Zhou Z, Donahue HJ. 2007. Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C545-52.
- Teichert-Kuliszewska K, Kutryk MJ, Kuliszewski MA, Karoubi G, Courtman DW, Zucco L, Granton J, Stewart DJ. 2006. Bone morphogenetic protein receptor-2 signaling promotes pulmonary arterial endothelial cell survival: implications for loss-of-function mutations in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Circ Res* 98:209-17.
- ten Dijke P. 2006. Bone morphogenetic protein signal transduction in bone. *Curr Med Res Opin* 22 Suppl 1:S7-11.
- Thebaud NB, Pierron D, Bareille R, Le Visage C, Letourneur D, Bordenave L. 2007. Human endothelial progenitor cell attachment to polysaccharide-based hydrogels: a pre-requisite for vascular tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 18:339-45.
- Thebaud NB, Rémy M, Bareille R, Bourget C, Daculsi R, Bordenave L. 2008. Cellules progénitrices endothéliales issues de sang périphérique humain : applications à l'ingénierie vasculaire. 9ème Forum des Jeunes Chercheurs en Odontologie.
- Thi MM, Kojima T, Cowin SC, Weinbaum S, Spray DC. 2003. Fluid shear stress remodels expression and function of junctional proteins in cultured bone cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C389-403.
- Thomas T, Martin A, Lafage-Proust MH. 2008. *Physiologie du tissu osseux*. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris) Appareil Locomoteur.
- Tokuda H, Kozawa O, Uematsu T. 2000. Basic fibroblast growth factor stimulates vascular endothelial growth factor release in osteoblasts: divergent regulation by p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Bone Miner Res* 15:2371-9.

- Troen BR. 2003. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. *Exp Gerontol* 38:605-14.
- Trueta J, Harrison MH. 1953. The normal vascular anatomy of the femoral head in adult man. *J Bone Joint Surg Br* 35-B:442-61.
- Unger RE, Sartoris A, Peters K, Motta A, Migliaresi C, Kunkel M, Bulnheim U, Rychly J, Kirkpatrick CJ. 2007. Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials* 28:3965-76.
- Vacanti CA, Bonassar LJ, Vacanti MP, Shufflebarger J. 2001. Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone. *N Engl J Med* 344:1511-4.
- Van Blitterswijk CA (2008): "Tissue Engineering."
- Vanhoutte PM. 2003. Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease. *Circ J* 67:572-5.
- Velleman SG. 2000. The role of the extracellular matrix in skeletal development. *Poult Sci* 79:985-9.
- Vilamitjana-Amedee J, Bareille R, Rouais F, Caplan AI, Harmand MF. 1993. Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 29A:699-707.
- Villars F, Bordenave L, Bareille R, Amedee J. 2000. Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF? *J Cell Biochem* 79:672-85.
- Villars F, Guillotin B, Amedee T, Dutoya S, Bordenave L, Bareille R, Amedee J. 2002. Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C775-85.
- Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL. 2004. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* 103:3258-64.
- Volkmer E, Drosse I, Otto S, Stangelmayer A, Stengele M, Kallukalam BC, Mutschler W, Schieker M. 2008. Hypoxia in static and dynamic 3D culture systems for tissue engineering of bone. *Tissue Eng Part A* 14:1331-40.
- Walker DL, Vacha SJ, Kirby ML, Lo CW. 2005. Connexin43 deficiency causes dysregulation of coronary vasculogenesis. *Dev Biol* 284:479-98.
- Wallez Y, Vilgrain I, Huber P. 2006. Angiogenesis: the VE-cadherin switch. *Trends Cardiovasc Med* 16:55-9.
- Wang DS, Miura M, Demura H, Sato K. 1997. Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells. *Endocrinology* 138:2953-62.
- Wang H, Keiser JA. 1998. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1. *Circ Res* 83:832-40.
- Wang Y, Volloch V, Pindrus MA, Blasioli DJ, Chen J, Kaplan DL. 2007a. Murine osteoblasts regulate mesenchymal stem cells via WNT and cadherin pathways: mechanism depends on cell-cell contact mode. *J Tissue Eng Regen Med* 1:39-50.
- Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, Boussein ML, Faugere MC, Guldberg RE, Gerstenfeld LC, Haase VH, Johnson RS, Schipani E, Clemens TL. 2007b. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest* 117:1616-26.
- Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmoller M, Russo PA, Bolte H, Sherry E, Behrens E, Terheyden H. 2004. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 364:766-70.

- Weber LM, Hayda KN, Haskins K, Anseth KS. 2007. The effects of cell-matrix interactions on encapsulated beta-cell function within hydrogels functionalized with matrix-derived adhesive peptides. *Biomaterials* 28:3004-11.
- Weinbaum S, Cowin SC, Zeng Y. 1994. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *J Biomech* 27:339-60.
- Wenger A, Stahl A, Weber H, Finkenzeller G, Augustin HG, Stark GB, Kneser U. 2004. Modulation of in vitro angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 10:1536-47.
- Wright LM, Maloney W, Yu X, Kindle L, Collin-Osdoby P, Osdoby P. 2005. Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts. *Bone* 36:840-53.
- Xin X, Yang S, Ingle G, Zlot C, Rangell L, Kowalski J, Schwall R, Ferrara N, Gerritsen ME. 2001. Hepatocyte growth factor enhances vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo. *Am J Pathol* 158:1111-20.
- Yamaoka H, Asato H, Ogasawara T, Nishizawa S, Takahashi T, Nakatsuka T, Koshima I, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, Hoshi K. 2006. Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *J Biomed Mater Res A* 78:1-11.
- Yang Q, McHugh KP, Patntirapong S, Gu X, Wunderlich L, Hauschka PV. 2008. VEGF enhancement of osteoclast survival and bone resorption involves VEGF receptor-2 signaling and beta(3)-integrin. *Matrix Biol*.
- Yin T, Li L. 2006. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* 116:1195-201.
- Yu H, Vandevord PJ, Gong W, Wu B, Song Z, Matthew HW, Wooley PH, Yang SY. 2008. Promotion of osteogenesis in tissue-engineered bone by pre-seeding endothelial progenitor cells-derived endothelial cells. *J Orthop Res* 26:1147-52.
- Zelzer E, Mamluk R, Ferrara N, Johnson RS, Schipani E, Olsen BR. 2004. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development* 131:2161-71.
- Zelzer E, McLean W, Ng YS, Fukai N, Reginato AM, Lovejoy S, D'Amore PA, Olsen BR. 2002. Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development* 129:1893-904.
- Zhang M, Xuan S, Boussein ML, von Stechow D, Akeno N, Faugere MC, Malluche H, Zhao G, Rosen CJ, Efstratiadis A, Clemens TL. 2002. Osteoblast-specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization. *J Biol Chem* 277:44005-12.
- Zhang Q, Guo R, Lu Y, Zhao L, Zhou Q, Schwarz EM, Huang J, Chen D, Jin ZG, Boyce BF, Xing L. 2008. VEGF-C, a lymphatic growth factor, is a RANKL target gene in osteoclasts that enhances osteoclastic bone resorption through an autocrine mechanism. *J Biol Chem* 283:13491-9.
- Zheng H, Fu G, Dai T, Huang H. 2007. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 50:274-80.
- Ziros PG, Gil AP, Georgakopoulos T, Habeos I, Kletsas D, Basdra EK, Papavassiliou AG. 2002. The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 277:23934-41.
- Zwaginga JJ, Doevendans P. 2003. Stem cell-derived angiogenic/vasculogenic cells: possible therapies for tissue repair and tissue engineering. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30:900-8.